

Contrôle de la vitesse de germination chez le maïs (*Zea mays*) : étude de la voie de biosynthèse des acides aminés issus de l'aspartate et recherche de QTLs

THÈSE DE DOCTORAT

Spécialité : Biologie Cellulaire et Moléculaire Végétale

ECOLE DOCTORALE D'ANGERS

Présentée et soutenue publiquement le 12 décembre 2006 à Angers par :

Fabiola Johana ANZALA

Devant le jury ci-dessous :

Jean-Daniel VIEMONT	Professeur (Université d'Angers)	Président
Bertrand HIREL	Directeur de recherche (INRA de Versailles)	Rapporteur
Jean-François MOROT-GAUDRY	Directeur de recherche (INRA de Versailles)	Rapporteur
Catherine GIAUFFRET	Chargée de recherche (INRA d'Estrées-Mons)	Examinatrice
Marie-Christine MORERE LE PAVEN	Maître de conférence (Université d'Angers)	Co-encadrante
Anis LIMAMI	Professeur (Université d'Angers)	Directeur de thèse

UMR 1191 Physiologie Moléculaire des Semences (Université d'Angers, INH, INRA)

Sommaire

<i>Remerciements</i>	5
<i>Liste des abréviations</i>	8
<i>Liste des figures</i>	10
<i>Liste des tableaux</i>	13
INTRODUCTION	14
Le maïs	14
La graine	18
La germination	19
La germination et le métabolisme azoté	21
Objectif de la thèse	27
MATERIEL ET METHODES	29
1- Matériel végétal	29
1. 1- Les lignées parentales	29
1. 2- Les lignées en ségrégation	30
2- Condition de germination	31
2. 1- Germination des lignées parentales Io et F2 dans le cadre de l'étude de la voie de l'aspartate	31
2. 2- Germination des lignées BC2S5 dans le cadre de l'étude QTL	31
3- Phénotypage	32
3. 1- Poids	32
3. 2- Vitesse de germination	32
3. 3- Elongation de la radicule	33
4- Etude statistique des caractères	33
4. 1- Distribution des caractères	33
4. 2- Corrélation entre les caractères	33
5- Analyse des acides nucléiques	34
5. 1- Extraction d'ADN génomique	34
5. 2- Extraction des ARN totaux au phénol chaud	34
5. 3- Purification des ARNm	35
5. 4- Dosage des acides nucléiques	35
5. 5- Reverse Transcription	36
5. 6- PCR	36
5. 7- qt-RT-PCR	38

5. 8- Electrophorèse _____	40
6- Clonage de fragments _____	41
6. 1- RACE PCR _____	41
6. 2- Préparation de l'insert _____	42
6. 3- Vecteur _____	43
6. 4- Transformation bactérienne _____	44
7- Extraction et étude de l'aspartate kinase _____	45
7. 1- Extraction de l'aspartate kinase _____	45
7. 2- Dosage de l'activité Aspartate kinase _____	45
8- Etude des acides aminés _____	46
8. 1- Extraction d'acides aminés _____	46
8. 2- Dosage des acides aminés totaux par la méthode de Rosen _____	46
8. 3- Dosage des acides aminés par chromatographie _____	47
8. 4- Dosage des acides aminés marqués au ¹⁵ N par GC-MS _____	50
9- Cartographie des loci contrôlant des caractères quantitatifs _____	52
9. 1- Principe de la recherche de QTL _____	53
9. 2- Carte génétique _____	54
9. 3- La recherche de QTLs _____	55
10- Analyse Bioinformatique _____	57
10. 1- Dans l'étude Io x F2 _____	57
10. 2- Dans l'étude F2 x F334 _____	57

Chapitre I : Caractérisation de la voie de l'aspartate au cours de la germination des deux génotypes Io à germination rapide et F2 à germination lente de maïs (Zea mays) 59

INTRODUCTION _____	60
RESULTATS _____	60
1- Germination des lignées parentales Io et F2 _____	60
2- Evolution de la teneur en acides aminés totaux au cours de la germination mesurée par la méthode de Rosen _____	62
3- Evolution de la teneur de chaque acide aminé au cours de la germination mesurée par HPLC _____	63
4- Gènes candidats _____	66
5- Les différentes formes d'aspartate kinase chez le maïs _____	67
6- Expression des gènes par qt-RT-PCR _____	69
7- Etude de l'activité aspartate kinase _____	71
8- Etude <i>in vivo</i> de la voie de l'aspartate par GCMS-HRSIM chez les lignées Io et F2 _____	71
9- Germination sur acides aminés de la voie de l'aspartate _____	75
DISCUSSION _____	78
CONCLUSION _____	84

<i>Chapitre II : Recherche de QTLs impliqués dans l'effet inhibiteur de la lysine sur la vitesse de germination du maïs (Zea mays)</i>	87
INTRODUCTION	88
RESULTATS	91
1- Germination et élongation de la racicule des lignées parentales F2 et F334	91
2- Polymorphisme des aspartate kinases entre les lignées F2 et F334	93
3- Distribution des caractères	97
4- Corrélation entre les caractères	100
5- L'analyse de QTLs	101
6- Recherche de gènes candidats	106
DISCUSSION	112
CONCLUSION	124
<i>Chapitre III : Recherche de QTLs impliqués dans la vitesse de germination du maïs (Zea mays) en condition de basse température</i>	125
INTRODUCTION	126
RESULTATS	128
1- Germination en condition de basse température	128
2- QTLs de vitesse de germination à 13°C	130
DISCUSSION	131
CONCLUSION	134
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES GENERALES	135
<i>Références Bibliographiques</i>	141
ANNEXES	148

Remerciements

*Après 3 ans de thèse je vois le bout, non sans une petite pointe de tristesse. Maintenant, vient l'heure des bilans et un jury va se réunir pour examiner le travail scientifique. J'exprime toute ma gratitude au D.R. **Bertrand Hirel** et D.R. **Jean-Francois Morot-Gaudry** d'avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse, ainsi qu'à Dr **Cathérine Giauffret** d'en être l'examinatrice, sans oublier le président de Jury Pr **Jean-Daniel Viemont**.*

Mais je ne serais pas arrivée jusqu'ici sans certaines personnes que je tiens à remercier.

*Je remercie vivement le Pr **David Macherel** de m'avoir accueillie au sein de l'UMR Physiologie Moléculaire des Semences.*

*J'exprime une vraie gratitude au Pr **Anis Limami** qui m'a donné l'opportunité de faire une thèse. Avant mon passage au laboratoire, j'étais une petite bavarde toujours au premier rang, ce qui n'est normalement pas la place des éléments perturbateurs. Malgré le désagrément causé dans l'un de ses cours, le Pr Anis Limami m'a permise de faire un stage de licence dans son laboratoire. Ni lui ni moi, ne savions à ce moment là que je signais pour 6 ans. Mais c'est sans regret, enfin presque ! Merci d'avoir fait des pieds et des mains pour trouver un financement de thèse ; je sais que ça n'a pas été sans effort et sans sacrifice... Merci de l'accompagnement scientifique tout au long de ces six années. Je vous remercie vivement pour la confiance que vous m'avez accordée.*

*Je remercie **Marie-Christine Morère Le Paven** pour avoir accepté de m'encadrer tous les jours à la paillasse, dans mes réflexions...mais pas seulement. He oui, si j'ai de nombreuses qualités, enfin j'espère ! l'orthographe et la grammaire sont loin, mais*

vraiment loin d'en faire partie. Alors merci, MEEERRRCCIII ! Maric d'avoir eu la patience de me lire et de me relire. Je te suis très reconnaissante d'avoir retrouvé tous les « ées » et les « s » qui s'étaient égarés lors de la rédaction de la thèse. Merci de ta tentative de me convertir à la lecture. Promis ! Je réfléchis à la possibilité et à la nécessité de faire des efforts. Je te remercie pour le soutien scientifique et personnel que tu m'as apportés.

Au cours de cette thèse j'ai été accueillie dans trois laboratoires : l'UMR INRA/USTL 1281, stress abiotiques et différenciation des végétaux cultivés, Estrées – Mons, France, l'UMR INRA 950 de Physiologie et Biochimie Végétales de l'université de Caen et le laboratoire du Service Commun d'Analyses Spectroscopiques (SCAS) de l'université d'Angers. Je remercie Catherine Giauffret, David Rondeau et Bernard Cliquet ainsi que leurs équipes pour le bon déroulement de mes séjours dans leurs laboratoires, avec une mention particulière pour Anne-lise Laisne, Odile Jamillon, Dominique Rabier, Alexandra Bré et Sylvie Fournier.

Je remercie vivement tous les membres de l'équipe P.A.V.E. et le seul représentant de l'équipe GenHort, Didier Peltier, avec qui nous partageons les bâtiments, mais aussi les conseils, les aides techniques, les produits : OUPS j'ai plus d'enzyme tu peux m'en passer ? Ben ! Toutes les plaques d'électrophorèse sont prises... je peux ? Comment utilise-t-on ce truc ? Ca veut dire quoi ça ? Un merci particulier au Pr Philippe Simoneau pour son aide lors de ma participation au congrès Eucarpia à Budapest.

Je remercie tous les membres de l'A.R.E.S., les meilleurs instants ont été partagés lors des fameux pique-niques annuels après les exposés d'équipes. Merci à vous tous. Je n'oublie pas Françoise Montrichard et Fatima Alkhalifioui pour l'accueil lors du séjour à Berkeley. Merci Olivier Leprince pour avoir tenté d'obtenir un financement pour les derniers mois de la thèse.

Un merci particulier à Laure Viau, Claudie Ricoult et Bruno Hamon qui veillent au bon fonctionnement de l'étage ; on ne le dit jamais assez.

Merci à Pascal Poupard pour l'ambiance dans le bureau. Cette ambiance, No Stress, partagée au quotidien pendant plus de quatre ans, m'a permis d'effectuer ma thèse dans de très bonnes conditions psychologiques. Merci beaucoup de ton soutien.

Je dédie ma thèse à mon grand-père Robert Louis qui n'a pas attendu la fin pour partir. Je la dédie aussi à ma grand-mère et à ma mère.

Dé fam doubout, sé grace a zot si mwen la jodla.

Je n'oublie pas le reste de ma famille et mes amis, nombreux, qui m'ont soutenue.

Fais de ta vie un rêve et fais de ton rêve une réalité.....

Liste des abréviations

°C :	Degrés celcius
ADN(c) :	acide désoxyribonucléique (complémentaire)
AK:	aspartate kinase
AKH:	aspartate kinase-homosérine déshydrogénase
Ala:	Alanine
Arg :	Arginine
ARN :	acide ribonucléique
Asn :	Asparagine
Asp :	Aspartate
BC2S3, BC2S5:	back-cross (2 successifs) autofécondation (3 ou 5 successifs)
Ct :	Cycle threshold
DEPC :	Diéthylpyrocarbonate
DNase :	Désoxyribonucléase
dNTP:	désoxyribonucléotides Triphosphates
E.:	élongation de la racicule
EDTA :	Acide éthylène diamine tétra-acétique
g :	unité d'accélération gravitationnelle
GC-MS:	Chromatographie en phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse
Glu :	Glutamate
Gln :	Glutamine
Gly :	Glycine
HPLC:	Chromatographie Liquide Haute Performance
HRSIM :	Hight Resolution-Single Ion Monitoring
HSDH:	HomoSérine DésHydrogénase
Ile:	Isoleucine
INRA :	Institut National de Recherche Agronomique
Leu :	Leucine
Lys :	Lysine
Met:	Methionine
NILs:	Near Isogenique Lines
p/v :	poids / volume
PCR :	Polymerase Chain Reaction
Phe:	Phénylalanine
QTL :	Quantitative Trait Loci
qt-RT-PCR :	quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
RILs :	Recombinant Isogenique Lines

RT :	Reverse Transcriptase
SDS :	Sodium Dodécyl Sulfate
Ser :	Sérine
T50 :	temps nécessaire à la germination de 50% des graines
TBE :	Tris borate EDTA
Thr:	Threonine
Tris :	Tris(hydroxyméthyl)-aminométhane
Tyr:	Tyrosine
UMR :	Unité Mixte de Recherche
UV :	UltraViolet
V :	volt
v/v :	volume / volume
Val:	Valine
UTR :	UnTranslated Region

Liste des figures

Figure 1 : Diversité des épis de maïs	15
Figure 2 : Epi et panicule de la téosinte.	16
Figure 3 : Cartographie de la consommation de maïs dans le monde	17
Figure 4 : Les différentes parties d'un grain de maïs (vue en coupe longitudinale).	18
Figure 5 : Principaux événements liés à la germination.	19
Figure 6 : Cycle GS/GOGAT	21
Figure 7 : Diagramme simplifié de la biosynthèse des acides aminés de la voie de l'aspartate.	23
Figure 8 : Structure moléculaire des ADNc codant pour l'aspartate-kinase-homosérine-déshydrogénase.	24
Figure 9 : Biosynthèse des acides aminés de la voie de l'aspartate en fonction de l'activité de l'aspartate kinase mono-fonctionnelle ou bi-fonctionnelle.	25
Figure 10 : Lignées parentales Io, F2 et F334.	29
Figure 11 : Evolution des pourcentages alléliques et génotypiques au cours de la production de la population BC2S5 étudiée.	30
Figure 12 : Courbe de germination.	32
Figure 13 : Carte du vecteur pCR® 2.1 TOPO. (invitrogen).	43
Figure 14 : Principe de la chromatographie.	48
Figure 15 : Schéma d'une chromatographie liquide haute performance.	49
Figure 16 : Principe du marquage isotopique.	50

Figure 17 : Schéma d'une chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse.	51
Figure 18 : Principe de l'analyse QTL.	53
Figure 19 : Effet additif du QTL.	56
Figure 20 : Principe de la projection de cartes génétiques.	58
Figure 21 : Germination des lignées Io et F2.	61
Figure 22 : Evolution de la teneur en acides aminés de l'embryon des lignées Io et F2.	64
Figure 23 : Evolution de la teneur en acides aminés de l'albumen des lignées Io et F2.	65
Figure 24 : Carte génétique partielle du maïs (chromosomes 2 et 4) et positionnement des trois QTLs de vitesse de germination (T50).	67
Figure 25 : Alignement des séquences partielles des deux isoformes d'aspartate kinase-homosérine déshydrogénase (<i>akh1</i> et <i>akh2</i>).	68
Figure 26 : Alignement des séquences partielles des deux isoformes d'aspartate kinase (<i>ask1</i> et <i>ask2</i>).	68
Figure 27 : Analyse par qt-RT-PCR de l'expression des gènes codant pour l'ARNr 18S.	69
Figure 28 : Analyse par qt-RT-PCR de l'expression des gènes <i>ask1</i> , <i>ask2</i> , <i>akh1</i> et <i>akh2</i> .	70
Figure 29 : Pourcentage de l'isotope ¹⁵ N dans les acides aminés.	73
Figure 30 : Variation des acides aminés - ¹⁵ N et des acides aminés- ¹⁴ N dans l'embryon des lignées Io et F2 du maïs	74
Figure 31 : Courbe de germination de la lignée Io (A) et de la lignée F2 (B) en présence d'acides aminés.	76
Figure 32 : Germination des grains de la lignée Io en présence d'acides aminés.	77
Figure 33 : Germination des grains de la lignée F2 en présence d'acides aminés.	77
Figure 34 : Proportion de chaque acide aminé dans l'embryon de la graine sèche provenant des lignées Io et F2.	79

Figure 35 : Schéma simplifié de la biosynthèse de la méthionine et de la thréonine. _____	<u>82</u>
Figure 36 : Schéma des voies principales du métabolisme de l'aspartate au cours de la germination en fonction des lignées. _____	<u>86</u>
Figure 37 : Germination des lignées F2 et F334. _____	<u>91</u>
Figure 38 : Courbe de germination des lignées F2 et F334 en présence d'acides aminés. _____	<u>92</u>
Figure 39 : Germination des graines des lignées F2 et F334 en présence d'acides aminés. _____	<u>93</u>
Figure 40 : Analyse par qt-RT-PCR de l'expression des gènes <i>ask1</i> , <i>ask2</i> , <i>akh1</i> et <i>akh2</i> . _____	<u>94</u>
Figure 41 : Alignement des séquences clonées du gène <i>ask2</i> provenant des lignées F2 et F334. _____	<u>96</u>
Figure 42 : Ségrégation des allèles <i>ask2</i> dans la population de BC2S5. _____	<u>96</u>
Figure 43 : Positionnement du gène <i>ask2</i> sur le chromosome 3. _____	<u>97</u>
Figure 44 : Distribution des caractères au sein de la population. _____	<u>99</u>
Figure 45 : Co-localisation des QTLs. _____	<u>108</u>
Figure 46 : Carte génétique partielle du maïs (chromosomes 1, 2, 3, 4, 5, 7 et 10) et positionnement du QTL poids, des QTLs de vitesse de germination (T50) et d'élongation de la racicule (E). _____	<u>115</u>
Figure 47 : Position de la cystathionine- β -lyase au sein de la voie de l'aspartate. _____	<u>122</u>
Figure 48 : Distribution des caractères au sein de la population. _____	<u>129</u>
Figure 49 : Carte génétique partielle du maïs (chromosomes 1, 2 et 4) et positionnement des QTLs de vitesse de germination (T50) à 20°C et à 13°C et du QTL poids. _____	<u>132</u>

Liste des tableaux

Tableau I: Importance de la production de maïs dans le monde.	14
Tableau II: Evolution du rendement entre l'ancêtre du maïs, la téosinte et le maïs actuellement cultivé.	16
Tableau III : Liste des amorces utilisées. E : efficacité des amorces R ² : pente de la droite.	37
Tableau IV : Teneur en acides aminés de l'embryon et de l'albumen des lignées Io et F2.	62
Tableau V: Corrélation entre caractères pris deux à deux.	100
Tableau VI : QTLs putatifs.	104
Tableau VII : QTLs Putatifs	106
Tableau VIII a: Liste des gènes co-localisant avec les QTL de la Zone 1.	109
Tableau VIII b: Liste des gènes co-localisant avec les QTL de la Zone 2.	109
Tableau VIII c: Liste des gènes co-localisant avec les QTL de la Zone 3.	110
Tableau VIII d: Liste des gènes co-localisant avec les QTL de la Zone 4.	110
Tableau VIII e: Liste des gènes co-localisant avec le QTL spécifique T50 sur lysine.	111
Tableau IX : QTLs putatifs.	130

INTRODUCTION

Le maïs

Le maïs (*Zea mays L.*) est une plante tropicale herbacée annuelle de la famille des graminées (Poacées). Il est originaire d'Amérique Centrale et a été introduit en Europe au XVI^{ème} siècle. Le maïs est largement cultivé comme céréale pour ses grains riches en amidon et représente la première production de céréale devant le riz et le blé.

En Europe, la France avec 13 Mt, l'Italie avec 11 Mt et la Roumanie avec 10 Mt sont les principaux producteurs de maïs. La France est le 7^{ème} producteur mondial après les Etats-Unis, la Chine, le Brésil, le Mexique, l'Argentine et l'Inde (Tableau n°I).

Tableau I: Importance de la production de maïs dans le monde. Données issues du site internet de la FAO (Food and agricultural organization of the united nations) <http://www.fao.org> en 2006

	Production millions de tonnes	Rang du maïs dans la production nationale	Exportation millions de tonnes
États unis	280	1	48
Chine	131	4	23
Brésil	35	6	5
Mexique	21	4	-----
Argentine	20	4	10
Inde	15	3	1
France	13	6	6
Indonésie	12	5	-----
Afrique du sud	12	1	0,4
Italie	11	7	-----

Le maïs a pour nom scientifique *Zea mays L.* ; il appartient à la classe des monocotylédones, sous-classe des *Commelinidaes*, ordre des Cypéales, famille des *Poacées* (ou Graminées) et la sous-famille des Panicoidées.

La taille de la tige de maïs est variable, de 40 cm à 10 m ; pour les variétés couramment cultivées, la taille varie généralement de 1 à 3 m. La tige unique est formée de plusieurs entrenœuds d'une vingtaine de centimètres, séparés par des nœuds. Au niveau de chaque nœud, de manière opposée, s'insèrent les feuilles à limbes allongées et à nervures parallèles. Le maïs est une espèce à pollinisation croisée, où les inflorescences femelles (épis) et les inflorescences mâles (panicules) sont disposées à des endroits distincts sur la plante. Les épis, souvent à raison d'un épi par tige, sont formés d'un nombre variable de rangées de grains (de 12 à 16), qui fourniront de 300 à 1000 grains pesant entre 0,19 et 0,3 g. Le grain de maïs est formé d'un embryon, d'un tissu de réserve, l'albumen et d'une enveloppe fine et translucide, le péricarpe. L'albumen est constitué essentiellement de grains d'amidon ; c'est l'amidon corné qui donne sa couleur au grain de maïs, généralement jaune, mais aussi blanc, rouge ou noir. La figure n°1. illustre la diversité de couleur, de forme et de taille que peuvent avoir les épis de maïs.



Figure 1: Diversité des épis de maïs

Le système racinaire du maïs est composé d'un grand nombre de racines adventives situées sur les nœuds à la base de la tige. Il est caractérisé par des racines traçantes (dites

racines de surface), qui prélèvent l'eau et les nutriments nécessaires à la plante dans les couches les plus superficielles du sol. Ce type d'exploitation des ressources du sol fait que la plante est très exigeante en azote et en eau, proportionnellement aux rendements élevés qu'elle permet, ce qui pose de graves problèmes environnementaux dans les régions tempérées.

Le maïs, comme la canne à sucre ou le sorgho, fait partie des plantes dites « en C4 ». Les plants en C4 réalisent une photosynthèse plus efficace que les plantes dites « en C3 ». La production de matière sèche de ces plantes peut dépasser le double de la production des autres céréales comme le blé.

Le maïs a été sélectionné de manière empirique au cours des siècles par les agriculteurs. Un grand nombre de preuves issues de la biologie moléculaire accréditent la théorie que la téosinte est l'ancêtre du maïs cultivé. La téosinte présentée figure n°2 est caractérisé par des épis de 5 cm portant environ 40 graines, pesant en moyen 2,5 g alors que l'épi de maïs cultivé est de 30 cm et possède 12 fois plus de graines pesant environ 0,3 g. (tableau n°II).

Tableau II: Evolution du rendement entre l'ancêtre du maïs, la téosinte et le maïs actuellement cultivé.



Figure 2 : Epi de la téosinte. Figure extraite du site www.wikipedia.com en 2006

	Téosinte	Maïs cultivé
Taille de l'épi (cm)	5	30
Poids d'un grain (g)	2,5	0,3
Nombre de grain / épi	40	500

Cette différence est le fruit d'un important travail de sélection. Les progrès les plus importants en terme d'amélioration du maïs reposent sur le développement des hybrides simples, puis des hybrides doubles et enfin sur la sélection assistée par marqueur. Les caractères sélectionnés avaient tout d'abord pour but d'améliorer le rendement en grains,

l'homogénéité morphologique pour la mécanisation et la résistance à la verse. Actuellement, les recherches en amélioration portent sur la résistance aux stress hydriques, aux faibles apports azotés, aux basses températures, aux parasites et au stress dû aux herbicides.

Le maïs est cultivé pour l'alimentation humaine et animale mais aussi pour de nombreuses utilisations dans l'industrie textile, pharmaceutique, dans la production de plastique biodégradable et de biocarburant. En ce qui concerne la consommation humaine au Mexique ou en Afrique du sud par exemple, les chiffres peuvent atteindre 50 à + de 100 kg/an/ par personne de maïs consommé (fig. n°3) d'où l'importance du maïs dans la production mondiale.

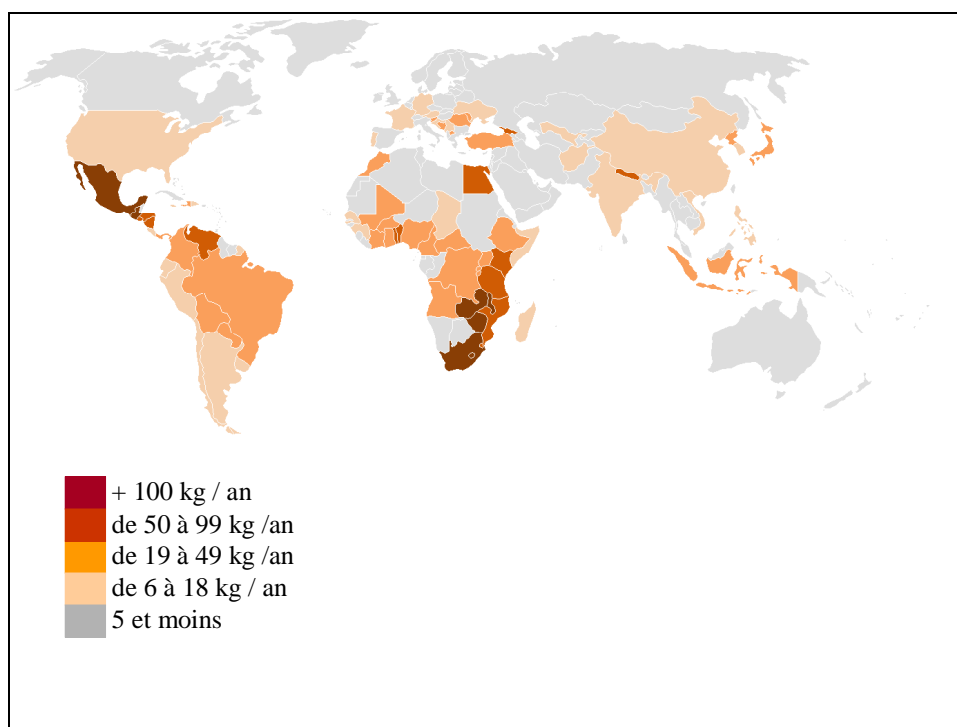


Figure 3 : Cartographie de la consommation de maïs dans le monde. Elle représente la quantité de maïs en kg consommée par habitant et par an en fonction des capitales de chaque pays. Figure extraite du site www.wikipedia.com en 2006.

La graine

La graine est un organe complexe de réserves, qui permet la multiplication de l'espèce et le passage des saisons défavorables. La graine est constituée d'un embryon et de tissus de réserves qui varient beaucoup d'une espèce à l'autre. En ce qui concerne la graine de maïs (fig. n°4) autrement appelé caryopse, elle est composée d'ébauche de racines et de feuilles embryonnaires dont le cotylédon.

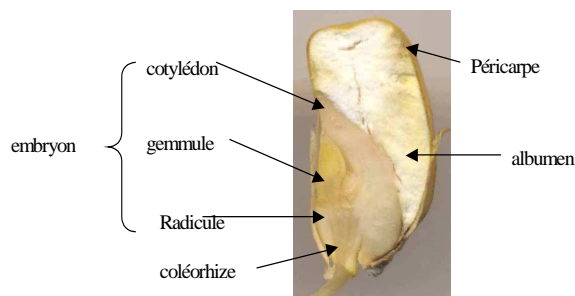


Figure 4: Les différentes parties d'un grain de maïs (vue en coupe longitudinale).

Les réserves sont principalement composées d'amidon contenu au niveau de l'albumen et de réserves protéiques et lipidiques présentes dans les cellules de la couche à aleurones. Lors de la formation d'une graine, le développement de la plante est stoppé car la matière sèche produite est essentiellement destinée à l'élaboration des réserves. Durant la phase de maturation qui suit, la teneur en amidon de la graine augmente progressivement et la teneur en eau diminue considérablement. L'acquisition de la tolérance à la dessiccation, nécessaire après une telle déshydratation, est associée à la synthèse de protéines spécifiques et l'accumulation de saccharose et d'oligosaccharides assurant la protection des structures cellulaires (Côme et Corbineau, 1998). Lorsque la teneur en eau devient très faible, l'activité respiratoire est extrêmement réduite, le métabolisme est

ralenti. Cette vie ralentie ou quiescente confère à la graine la faculté de résister pendant de longues périodes à des conditions extrêmes de température, de sécheresse, de radiation.

La transition entre la quiescence et la reprise du métabolisme est assurée par la balance hormonale au niveau de l'acide abscissique (ABA) et des gibbérellines (GA) ainsi que par le potentiel hydrique cellulaire.

La germination

La germination est une phase physiologique qui correspond à la transition de la phase de vie latente de la graine sèche à la phase de développement de la plantule. Le processus de germination commence dès que la graine sèche est hydratée. La cinétique de prise d'eau permet de caractériser la germination en trois phases (Bewley, 1997) (fig. n°5).

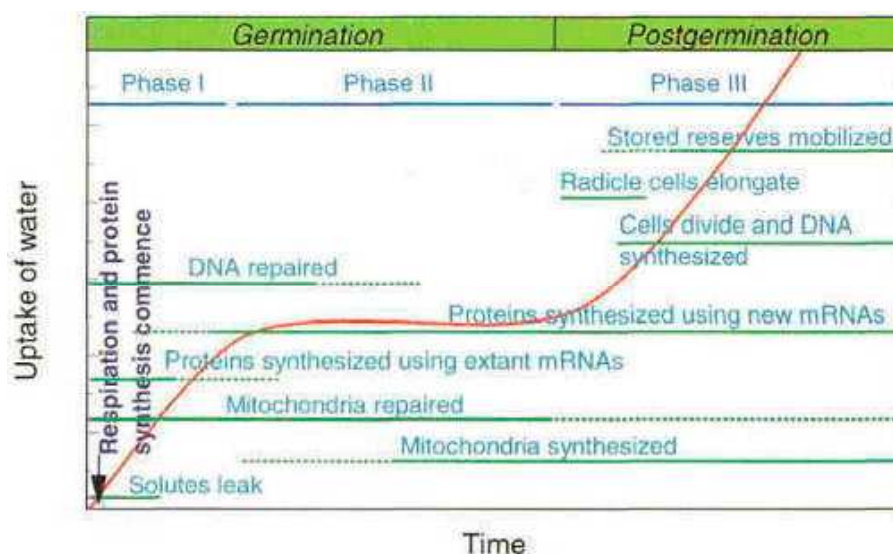


Figure 5 : Principaux événements liés à la germination. L'imbibition des graines suit une courbe triphasique. La phase I correspond à une prise d'eau rapide. La phase II est une phase de plateau qui se termine par la sortie de la radicule. La phase III est caractérisée par la reprise de l'imbibition. Seules les phases I et II correspondent à la germination au sens strict, alors que la phase III est une phase de croissance, postgerminative. Les traits indiquent la plage de temps pendant laquelle se déroule l'événement cité. D'après Bewley 1997.

La première phase ou **phase d'imbibition** est un phénomène d'entrée rapide et passive d'eau. Elle se déroule même si la graine n'est pas viable. Cette entrée d'eau est accompagnée d'une augmentation de la consommation d'oxygène attribuée à l'activation des enzymes mitochondriales.

La deuxième phase est la **phase de germination au sens strict**. Elle est caractérisée par une diminution de l'entrée d'eau ; l'hydratation des tissus et des enzymes est totale. La consommation en oxygène est stable. Durant cette phase, il y a reprise de la respiration et des activités métaboliques. La présence d'eau et d'oxygène permet l'activation des processus respiratoires et mitotiques. L'eau rend mobiles et actives les phytohormones hydrosolubles en stock dans la graine. C'est le cas des gibbérellines qui sont véhiculées vers la couche à aleurones où elles vont activer la synthèse d'hydrolases (telles que les α -amylases, les nucléases ou les protéinases) nécessaires à la dégradation des réserves, à la division et l'élongation cellulaire.

Les α -amylases hydrolysent l'amidon stocké dans l'albumen et libèrent des molécules de glucose, substrat du métabolisme respiratoire.

Les nucléases permettent la libération d'acides nucléiques impliqués dans la formation des cytokinines, hormones qui stimulent la division cellulaire.

Les protéases lysent les réserves protéiques qui favorisent la formation de phytohormones telles que l'auxine responsable de l'élongation des cellules.

La phase de germination au sens strict se termine avec la percée du tégument par la radicule, rendue possible grâce à l'allongement des cellules.

La troisième phase ou **phase de croissance post-germinative** est caractérisée à nouveau par une entrée d'eau et une augmentation importante de la respiration. La consommation de l'oxygène serait due aux enzymes néosynthétisées.

La germination subit l'effet de certains facteurs extérieurs, comme la disponibilité en eau, la température, qui a un impact direct sur le métabolisme et sur le taux d'oxygène dissout, ainsi que la lumière qui agit de manière différente sur les espèces. Elle inhibe la germination des espèces photosensibles négatives et stimule les photosensibles positives. Certaines caractéristiques internes de la graine influencent aussi la germination. En effet, la graine va germer plus ou moins vite en fonction de sa taille, de sa quantité de réserves ou de son génome.

La germination et le métabolisme azoté

De considérables inter-conversions d'acides aminés ont lieu au cours de l'hydrolyse des protéines durant la phase de germination. Ces inter-conversions contribuent à la production d'un spectre important d'acides aminés utilisés, soit pour la formation des protéines, soit dans la synthèse des métabolites clés (Gallardo *et al.*, 2002; Lea et Joy, 1983). Les acides aminés les plus importants, chez la plupart des végétaux, sont l'aspartate, l'asparagine, la glutamine et le glutamate qui ont une fonction dans le transport et le stockage de l'azote (Bewley et Black, 1994; Lam *et al.*, 1996). Au cours de la germination le transport de l'azote, des organes de réserve aux organes de croissance, est essentiellement sous forme de deux acides aminés, la glutamine et l'asparagine (Bewley et Black, 1994). Ils représentent plus de 70% des acides aminés dans la graine sèche et ont un rôle clé dans la synthèse des autres acides aminés et l'assimilation de l'ammonium toxique pour la cellule.

La glutamine peut être convertie en deux molécules de glutamate par l'action de l'enzyme GOGAT (E.C : 1.4.1.14) (Lea et Mifflin, 1974), en asparagine par l'action de l'enzyme asparagine synthase ou en aspartate par l'action de l'enzyme aspartate aminotransférase. Une des deux molécules de glutamate est recyclée en glutamine par l'action de la glutamine synthétase GS (E.C : 6.3.1.2). Le cycle de la GS/GOGAT (fig. n°6) joue un rôle important dans la gestion de l'azote au cours du développement. Il existe deux gènes de la glutamine synthétase, l'une présente dans le cytosol (GS1) et l'autre dans les plastes (GS2).

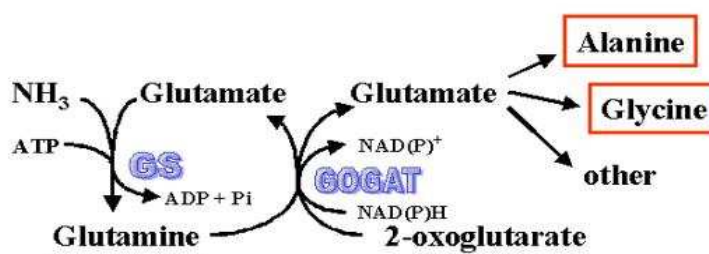


Figure 6 : Cycle GS/GOGAT. GS : glutamine synthétase GOGAT : glutamate synthase

Chez le maïs, il existe 5 gènes codant pour les GS1 : *gln1* et *gln2* ont été localisés sur le chr 1, *gln3*, *gln4* et *gln5* sur le chr 4, 5 et 10 respectivement. Un seul gène code pour la GS2. La famille multigénique de GS cytosolique est différenciellement exprimée au cours du temps et en fonction des organes ; elle joue un rôle spécifique en réponse aux besoins de la plante tout au long du développement (Cren et Hirel, 1999). En effet, les gènes codant pour la GS sont souvent associés à des caractères agronomiques et à des caractères du développement (Limami *et al.*, 1999 ; Limami *et al.*, 2002; Miflin et Habash, 2002). Une modification de l'expression des gènes codant la GS induit une modification du rendement en grains et de la teneur en certains acides aminés (asparagine, aspartate, et proline) chez le riz (Tabuchi *et al.*, 2005) et chez le lotier (Ortega *et al.*, 2004). Alternativement, la réaction catalysée par la GOGAT peut être également catalysée par la glutamate déshydrogénase GDH (E.C : 1.4.1.2). Des expériences faisant appel à du marquage au ¹⁵N ont permis de montrer que l'un des sens de la réaction réversible catalysée par la GDH pouvait être favorisé en fonction du stade physiologique. Dans des conditions de stress ou durant la sénescence, la GDH peut catalyser l'assimilation de l'ammonium sur le glutamate (Ferrario-Mery *et al.*, 2002; Masclaux *et al.*, 2000). Hormis dans ces conditions particulières, la GDH catalyse la réaction dans le sens de la libération d'ammonium. Au cours de la croissance post-germinative et en particulier lors du développement de l'axe embryonnaire de *Medicago truncatula*, la GDH fonctionnerait dans le sens de la libération de l'ammonium en absence d'apport d'ammonium extérieur (Glevarec *et al.*, 2004).

Le glutamate formé peut être dégradé en acide-4-aminobutyrate (GABA) par la glutamate décarboxylase. Cette enzyme est stimulée en cas de stress anaérobique et joue un rôle important dans le maintien du pH du cytosol (Bouche et Fromm, 2004). Le GABA formé sert également d'intermédiaire à la formation de l'alanine.

Ainsi, le rôle central de la glutamine au cours de la germination peut se justifier par sa prédominance par rapport aux autres acides aminés dans le grain sec et par la diversité des molécules dont elle est à l'origine. En effet, la glutamine permet directement ou indirectement la synthèse d'autres acides aminés (glutamate, aspartate et leurs dérivés) de molécules impliquées dans l'homéostasie et la détoxification (glutathion, GABA), de molécules liens entre métabolisme azoté et métabolisme carboné (oxaloacétate, α -cétoglutarate).

L'asparagine, l'autre acide aminé majoritaire dans des grains secs, peut être convertie en aspartate, par l'asparaginase (EC : 3.5.1.1). L'aspartate ainsi formé peut être converti par l'aspartate transaminase en oxaloacétate, lien avec le métabolisme des sucres ou en aspartyl-phosphate par l'aspartate kinase qui permet le fonctionnement de la voie de l'aspartate. Cette dernière permet, chez les végétaux et chez les bactéries, la synthèse d'acides aminés essentiels : méthionine, lysine, thréonine et isoleucine ainsi que le S-adénosylméthionine, précurseur de l'éthylène hormone de croissance et donneur de groupe méthyl (fig. n°7).

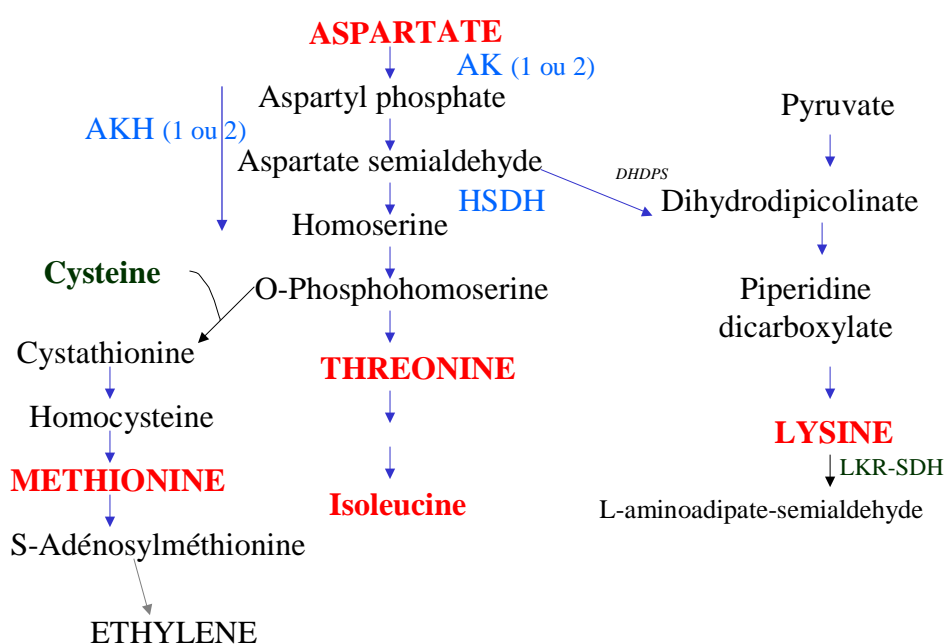


Figure 7 : Diagramme simplifié de la biosynthèse des acides aminés de la voie de l'aspartate. AK : aspartate kinase, AKH : aspartate-kinase-homoserine-déshydrogénase, HSDH : homoserine-déshydrogénase, DHDPS : dihydrodipicolinate synthase, LKR-SDH : lysine kétoglutarate réductase saccharopine dehydrogenase.

La première enzyme de cette voie, l'aspartate kinase (EC : 2.7.2.4), est une phosphotransférase avec un groupe carboxyle comme accepteur. Il existe deux gènes d'aspartate kinase (AK) dont les gènes sont cartographiés sur le chr 7S pour *ask1* et sur le chr 2L pour *ask2*. Elles se distinguent par la rétroinhibition qu'elles subissent. La première est sensible à la lysine et la deuxième à la lysine et au S-adenosylméthionine (Azevedo *et al.*, 1992a; Azevedo *et al.*, 1992b). L'homoserine déshydrogénase (EC : 1.1.1.3), troisième

enzyme de cette voie, est une oxydoréductase qui agit sur un groupe CH-OH donneur d'électrons avec NAD(P)⁺ comme accepteur. Elle catalyse la réaction de synthèse de l'homosérine à partir d'aspartate semialdéhyde. Il est à noter que la seconde enzyme est rarement mentionnée dans la littérature : il s'agit de l'aspartate β-semialdéhyde déshydrogénase (ASADH) (Weil, 2001). L'existence d'une enzyme bifonctionnelle, l'aspartate kinase-homosérine déshydrogénase (AKH) chez les plantes a été mise en évidence chez le pois (Aarnes et Rognes, 1974), puis confirmée chez le maïs (Azevedo *et al.*, 1992a). Les *akh* font partie d'une famille de gènes ayant une structure moléculaire présentée figure n°8 (Muehlbauer *et al.*, 1994). Les AKH possèdent un domaine ayant une activité aspartate kinase en Nter et un domaine homosérine déshydrogénase en Cter. Les gènes codant pour les différents gènes d'AKH ont été cartographiés chez le maïs sur le chr 4L pour l'*akh1* et sur le chr 2L pour l'*akh2*.

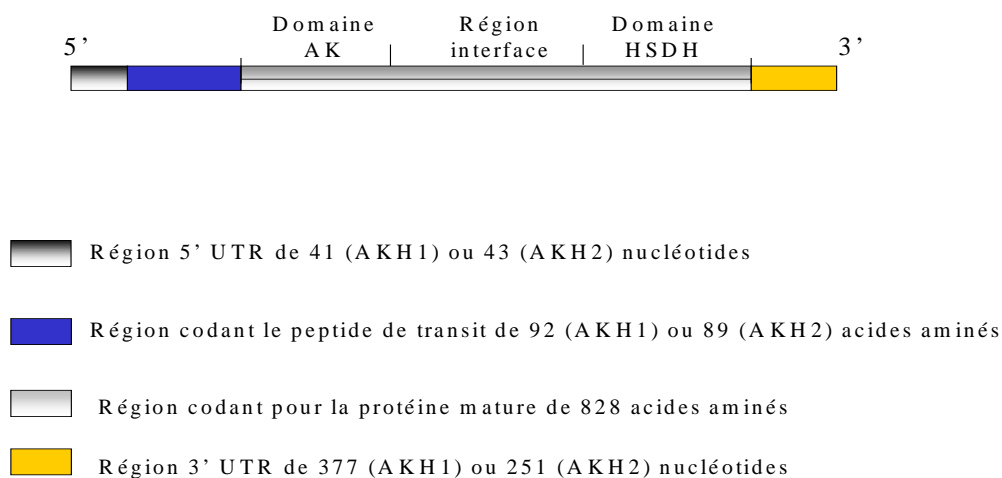


Figure 8: Structure moléculaire des ADNc codant pour l'aspartate-kinase-homosérine-déshydrogénase (Muehlbauer *et al.* 1994).

Au niveau du métabolisme des acides aminés, l'existence des deux formes, mono-fonctionnelle et bifonctionnelle, est très importante. En effet, l'enzyme mono-fonctionnelle permet de former un intermédiaire, l'aspartate-semialdéhyde, indispensable à la formation

de la lysine alors que l'enzyme bifonctionnelle court-circuite cette voie au profit de la formation de méthionine, thréonine et isoleucine (fig. n°9).

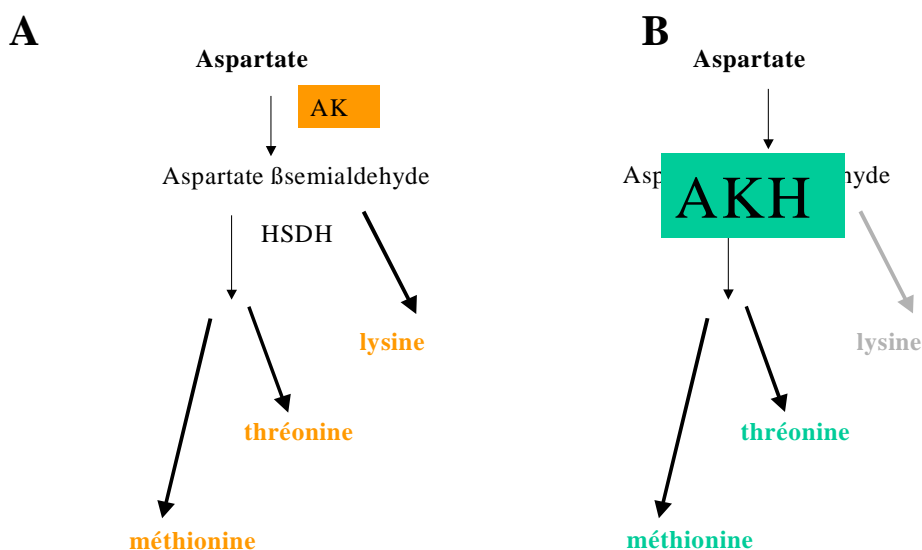


Figure 9: Biosynthèse des acides aminés de la voie de l'aspartate en fonction de l'activité de l'aspartate kinase mono-fonctionnelle ou bi-fonctionnelle. A. l'activité de l'aspartate kinase mono-fonctionnelle permet la synthèse des 3 acides aminés. B. l'activité de l'aspartate kinase bi-fonctionnelle court-circuite la voie de la lysine en faveur des voies de la méthionine et thréonine.

L'expression des différentes formes peut être modulée en fonction des besoins de la cellule, de l'organisme ou encore des conditions environnementales. En effet, des études ont montré que l'AKH, chez *Arabidopsis thaliana*, est régulée par la lumière et par le saccharose (Zhu-Shimoni *et al.*, 1997). L'AKH subit donc un contrôle spatial et temporel au sein des tissus végétaux, graines et fleurs (Azevedo et Lea, 2001; Zhu-Shimoni et Galili, 1998).

Après les réactions catalysées par les aspartate kinases, la voie de l'aspartate est divisée en trois branches, la branche de la lysine, la branche de la thréonine et celle de la méthionine. La dihydrodipicolinate synthase (DHDPS) catalyse la première réaction de la voie de biosynthèse de la lysine. Elle est très sensible à la rétroinhibition par la lysine. Elle contrôle, avec la lysine kétoréductase (LKR) enzyme du catabolisme de la lysine, la teneur en lysine des cellules. L'homosérine déshydrogénase (HSDH) catalyse la première réaction commune à la biosynthèse de la thréonine, méthionine et isoleucine, qui convertit

l'aspartate-4-semialdéhyde en homosérine. En général, il existe au moins deux formes d'homosérine déshydrogénase, une trimérique sensible à la rétroinhibition par la thréonine et l'autre dimérique insensible. (Galili, 1995) a montré que, *in vivo*, la forme dimérique peut être convertie en forme trimérique de manière réversible en fonction des concentrations en thréonine du milieu. L'homosérine est converti en phosphohomosérine par l'homosérine kinase. La thréonine synthase et la cystathionine γ -synthase sont en compétition pour la phosphohomosérine, substrat commun de la biosynthèse de thréonine et méthionine. La thréonine synthase est stimulée par la SAM ; en conséquence la teneur en méthionine est fortement liée à celle de la thréonine. En effet, des travaux chez *Arabidopsis* montrent que des gènes mutés codant pour la thréonine synthase induisent une accumulation de méthionine (Bartlem *et al.*, 2000).

La majeure partie des enzymes impliquées dans la synthèse de lysine et thréonine a été localisée dans les plastes, alors que les enzymes impliqués dans la synthèse de méthionine et de SAM ont été localisées dans le cytosol (Galili, 1995; Hanson et Roje, 2001). Ceci suggère un transport des métabolites des plastes vers le cytosol et sans doute une régulation spatiale de la synthèse de lysine, méthionine et thréonine en fonction des besoins de la cellule, de l'état physiologique et du stade de développement.

L'importance du flux de l'aspartate à travers la branche de méthionine au cours de la germination a été montrée par les travaux de (Gallardo *et al.*, 2002). L'inhibition de la synthèse de méthionine, par le DL-propargylglycine, ralentit la germination. Ceci est sans doute en rapport avec la formation de l'éthylène ou des polyamines, qui sont aussi produits par l'intermédiaire de la voie de l'aspartate. L'éthylène est impliqué dans la levée de la dormance tégumentaire et l'élongation de la racicule. Les polyamines sont produites par des réactions de décarboxylation des acides aminés, qui consomment des H^+ . L'accumulation des polyamines est impliquée dans les mécanismes d'homéostasie afin de maintenir la valeur du pH intracellulaire constante. Ils augmentent considérablement en réponse aux stress de l'environnement, aux conditions de potassium limitant, au déficit d'eau, au stress salin, aux manques d'oxygène et aux stress acides.

La lysine, produit de la voie de l'aspartate, est aussi un bon élément qui peut expliquer l'importance de cette voie dans le contrôle de la croissance et du développement (Zhu et Galili, 2004). L'accumulation de lysine dans une plante *Arabidopsis thaliana* transgénique, sur-exprimant la DHDPS et possédant une LKR éteinte par RNAi, a montré un effet physiologique négatif inhibant la croissance post-germinative de plantules (Zhu et

Galili, 2004). De nombreux travaux ont montré la difficulté d'augmenter la teneur en lysine dans les céréales par des manipulations génétiques (Cattoir – Reynaerts *et al.*, 1981; Vauterin et Jacobs, 1994; Zhu et Galili, 2004) sans doute parce qu'en plus d'un rôle dans la structure des protéines la lysine joue un rôle dans le développement de la plante.

Objectif de la thèse

La thèse a été réalisée au sein de l'UMR-INRA 1191 de Physiologie Moléculaire des Semences (PMS). L'UMR créée en 2000 regroupe des équipes de l'université d'Angers, de l'institut national d'horticulture (INH), et de l'institut national de recherche agronomique (INRA). Elle étudie les mécanismes moléculaires qui régissent la physiologie des semences et qui contribuent à l'expression de la qualité des semences (composition, conservation, tolérance au stress, vigueur germinative) avec des approches transdisciplinaires combinant la biochimie, la génétique, la protéomique et la physiologie. L'UMR-PMS est organisée en quatre équipes de recherche :

Mécanismes de tolérance à la dessiccation

Mitochondries et stress

Rôles des thiorédoxines

Métabolisme azoté et régulation

La thèse s'inscrit dans la thématique de l'équipe 'métabolisme azoté et régulation' dirigée par le Pr Anis Limami. Dans cette équipe, différents aspects du métabolisme azoté sont étudiés au cours de la germination de *Medicago Truncatula* et du maïs *Zea mays*. Chez Médicago, les travaux ont porté sur le couple d'enzymes GS/GOGAT et la GDH et leurs implications dans l'assimilation de l'ammonium au cours des phases précoces du développement (Glevarec *et al.*, 2004) et sur l'alanine aminotransférase et son implication dans la tolérance au stress hypoxique (Ricoult *et al.*, 2006). Chez le maïs, les travaux ont porté sur la relation entre le métabolisme azoté et la germination. Les premiers résultats ont

mis en évidence d'une part trois QTLs de vitesse de germination et d'autre part la contribution du gène *gln3* codant la GS, qui co-localise avec un des QTLs, au cours du processus de germination (Limami *et al.*, 2002). Le travail de thèse fait suite à ces travaux et a pour but d'analyser la pertinence d'autres gènes candidats révélés par l'analyse de QTL qui pourraient expliquer la variation phénotypique de l'efficacité de germination des lignées Io et F2. Au cours du chapitre I, nous avons analysé le polymorphisme de l'expression de gènes candidats co-localisant avec les QTLs de vitesse de germination. Nous avons également étudié le polymorphisme biochimique de la voie de l'aspartate par suivi isotopique ^{15}N . Les travaux du chapitre I, sur le polymorphisme moléculaire, biochimique et physiologique entre les deux lignées Io et F2, ont amené à s'interroger sur l'implication de la lysine dans le processus de germination. Nous avons étudié le rôle de la lysine par une approche QTL. Au cours de cette étude nous avons utilisé une population de back-cross avancé issue du croisement entre les lignées F2 et F334, produit par l'UMR INRA/USTL 1281, stress abiotiques et différenciation des végétaux cultivés, Estrées – Mons. Le chapitre II présente donc les zones du génome impliquées dans le contrôle de la vitesse de germination en présence ou en absence de lysine ainsi que les gènes localisés dans ces zones. En s'appuyant sur la littérature, quelques gènes ont été proposés comme candidats pour expliquer les mécanismes enclenchés au cours de la germination qui, d'une part induisent une différence au niveau de la vitesse de germination et d'autre part expliquent la différence d'effet de la lysine sur la germination entre les lignées F2 et F334. Par ailleurs, nous avons saisi l'opportunité de rechercher des QTLs de vitesse de germination dans des conditions de stress « froid » offert par les caractéristiques des lignées F2 et F334. En effet, ces deux lignées, l'une européenne et l'autre mexicaine, réagissent différemment au stress induit par les basses températures. De ce fait, il est possible de rechercher les bases génétiques qui expliquent ce polymorphisme de réponse aux basses températures au cours de la germination. Le chapitre III présente les zones du génome impliquées dans le contrôle de la vitesse de germination à 20°C (condition contrôle) et à 13°C (condition de stress).

A travers les trois chapitres abordés, l'intérêt général de ce travail est de pouvoir établir des bases génétiques et des caractéristiques moléculaires qui permettent à une lignée de maïs (*Zea mays*) de germer plus vite qu'une autre, ceci dans des conditions de germination normales ou défavorables.

MATERIEL ET METHODES

1- Matériel végétal

1. 1- Les lignées parentales

Io est une lignée à maturité semi-tardive, à grains dentés avec des nuances de rouge. Elle a été créée en 1985 par le groupe US-Iodent (fig. n°10).

F₂ est une lignée à maturité précoce, à grains cornés tout jaune. Elle a été créée par l'INRA en 1955. C'est une lignée française utilisée pour ses caractères agronomiques dans la production de variété européenne. F₂ est à l'origine de nombreuses variétés précoces qui ont permis l'extension du maïs au-delà de ses limites géographiques de cultures traditionnelles (fig. n°10).

F334 est une lignée exotique d'altitude, issue du Pool 10A du CIMMYT décrit par (Eagles et Lothrop, 1994). Elle est caractérisée par sa capacité à germer à 10°C alors que la germination de la lignée F₂ est inhibée à cette température. Elle présente un retard de floraison d'une moyenne de 15 jours par rapport à F₂ et une efficacité de détoxification performante (fig. n°10).

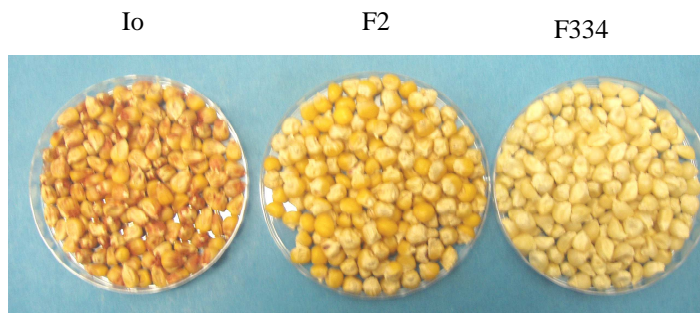


Figure 10 : Lignées parentales Io, F₂ et F₃₃₄.

Le croisement entre la lignée Io et la lignée F2 a permis la création d'une population de RILs utilisée dans l'étude de Limami *et al.* 2002. Cette étude met en évidence des QTLs de vitesse de germination, qui ont servi de bases aux travaux du chapitre I de cette thèse.

Le croisement entre F2 et F334 réalisé par l'équipe de l'UMR INRA/USTL 1281, stress abiotiques et différenciation des végétaux cultivés, Estrées – Mons, France a permis la création d'une population de back-cross avancé utilisée pour la détection de QTLs dans les chapitres II et III.

1. 2- Les lignées en ségrégation

Une population de 280 lignées BC2S3 (deux back-cross et trois autofécondations) de maïs (*Zea mays*), issue du croisement entre les lignées parentales homozygotes F2 et F334, est utilisée pour la création de la carte génétique.

Une sous-population de 125 lignées BC2S5 (deux back-cross et cinq autofécondations) est utilisée pour l'analyse génotypique et phénotypique nécessaire à la détection de QTLs. La population est caractérisée par des lignées présentant 87 % d'allèles de la lignée F2, 12% d'allèles de la lignée F334 (fig. n°11).

	% alléliques		% génotypiques		
	A	a	AA	Aa	aa
F2 x F334					
F2 (femelle) X F1	50	50	0	100	0
Back -cross					
BC1	75	25	50	50	0
Back -cross					
BC2	87,5	12,5	75	25	0
auto fécondation					
BC2-S1 1	87,5	12,5	81,25	12,5	6,25
auto fécondation					
BC2-S2	87,5	12,5	84,38	6,25	9,375
auto fécondation					
BC2-S3	87,5	12,5	85,94	3,13	10,94
auto fécondation					
BC2- S4	87,5	12,5	86,72	1,56	11,72
auto fécondation					
BC2-S5	87,5	12,5	87,11	0,78	12,11

Figure 11 : Evolution des pourcentages alléliques et génotypiques au cours de la production de la population BC2S5 étudiée.

2- Condition de germination

2. 1- Germination des lignées parentales Io et F2 dans le cadre de l'étude de la voie de l'aspartate

Les grains sont disposés par dix dans des boîtes de Petri sur du papier wattman imbibé de 5ml d'eau stérile. Les boîtes de Petri sont ensuite mises dans des chambres d'incubation à 20°C. Le choix de cette température est basé sur des travaux antérieurs : la germination des deux lignées Io et F₂ a été comparée à deux températures, 21°C et 25°C. A 21°C, la différence de T50 (temps nécessaire à la germination de 50% des grains) entre les deux lignées est plus importante qu'à 25°C, ce qui permet d'évaluer le polymorphisme physiologique des lignées parentales dans des conditions qui les différencient le plus.

Pour les analyses de l'expression des gènes et les dosages d'acides aminés, les graines incubées à 21°C sont récupérées après des temps d'imbibition différents : T 0h (grains secs) ; T 24h ; T 52h ; T 74h ; T 96h. Embryons et albumens sont séparés et immédiatement plongés dans l'azote liquide. Les échantillons ainsi congelés sont broyés, dans un broyeur à bille refroidi à l'azote liquide, jusqu'à obtention d'une poudre. La poudre obtenue est conservée à - 80°C en attente des différentes études.

Pour le dosage des acides aminés marqués au ¹⁵N, les grains sont imbibés 24h avec de l'eau stérile dans une chambre à 21°C puis 24h, 33h, 48h avec de l'aspartate ¹⁵N (99% excès). L'embryon est extrait des grains et réduit en poudre pour subir une extraction hydroalcoolique.

2. 2- Germination des lignées BC2S5 dans le cadre de l'étude QTL

Les grains des 125 lignées sont mis à germer par lots de 30 dans des boîtes de Petri avec 5 ml de solution stérile (eau, lysine ou méthionine). Les graines sont uniformément positionnées dans les boîtes de Petri avant l'imbibition. La germination se déroule dans des chambres de culture réglée à 20°C (+/- 0.5°C) pour l'expérience en condition contrôle, méthionine ou lysine et réglée à 13°C (+/- 3°C) pour l'expérience à basse température.

3- Phénotypage

Le phénotypage correspond à l'analyse numérique des différents caractères au sein d'une population en ségrégation dans le cadre d'une étude de génétique quantitative.

3. 1- Poids

Les 8 lots de 30 grains utilisés pour l'expérience ont été pesés sur une balance de précision.

3. 2- Vitesse de germination

30 grains par lignée et par expérience sont disposés de manière identique dans des boîtes de Petri et sont incubés dans une chambre de culture pendant 24h. 5 ml de solution (eau, lysine 5 mM ou méthionine 5 mM) sont ajoutés, ce qui correspond au T_0 de l'imbibition. L'expérience à basse température est réalisée en ajoutant 5ml d'eau après 24h d'incubation dans une chambre réglée à 13°C. Le pourcentage de germination est relevé toutes les 3h pendant 260h, afin d'établir une courbe de germination en fonction du temps pour les 125 lignées dans les 4 conditions.

Le caractère vitesse de germination est déterminé par le T_{50} , (temps nécessaire à la germination de 50% des grains). Le T_{50} est évalué en utilisant l'équation $y = ax + b$ issue des courbes de germination (fig. n°12). La vitesse de germination (T_{50}) est mesurée en heure.

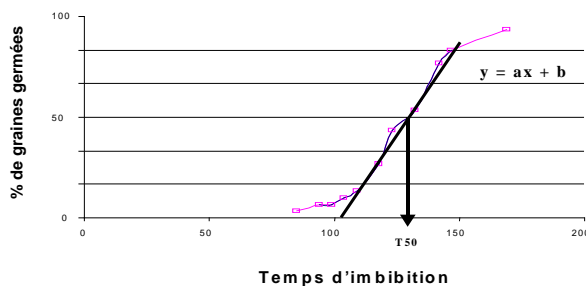


Figure 12 : Courbe de germination. Le T_{50} , qui correspond au temps nécessaire à la germination de 50% des grains, est calculé grâce à l'équation $y = ax + b$ de la tangente à la courbe de germination.

3. 3- Elongation de la racine

L'élongation de la racine est évaluée par la mesure de la taille de la racine après 124h d'imbibition. La mesure est effectuée à l'aide d'une ficelle de coton, qui permet de prendre en compte les courbures de la racine. La taille obtenue est divisée par la période d'élongation. Cette période correspond à 124h moins le T50. L'élongation (E.) est mesurée en mm/heure.

4- Etude statistique des caractères

4. 1- Distribution des caractères

La distribution de l'ensemble des caractères, mesurés au sein de la population de 125 lignées BC2S5, est présentée graphiquement afin d'évaluer la normalité de la distribution. Dans une distribution normale, la représentation graphique des effectifs des différentes classes doit révéler une allure gaussienne.

4. 2- Corrélation entre les caractères

La corrélation entre deux caractères est évaluée grâce au coefficient de corrélation r de Pearson avec le logiciel Excel. r^2 représente la proportion de la variation du caractère A qui explique la variation du caractère B.

5- Analyse des acides nucléiques

5. 1- Extraction d'ADN génomique

De 100 à 250 mg de feuille sont prélevés et 700 μ L de tampon d'extraction ATMAB ou CTAB et 1,4 μ l de β -Mercaptoéthanol sont ajoutés. Le mélange est agité et incubé à 37°C pendant 1 h. A la suite de l'incubation, 750 μ L de tampon Chloroforme/Isoamyl alcool (CIA) 25/1 (v/v) sont ajoutés à l'ensemble et les tubes sont agités à l'aide d'un vortex. Les tubes sont centrifugés à 20000 g pendant 5 min à 4°C. Le surnageant est prélevé et mélangé à 1/10 d'une solution CTAB 10% dans NaCl 0,7 M, en présence de 750 μ L de CIA. Les tubes sont ensuite centrifugés à 20000 g pendant 5 min à 4°C. Un volume d'isopropanol est ajouté au surnageant afin de précipiter l'ADN pendant 30 min à température ambiante. Une dernière centrifugation de 15 min à 20000 g à 4°C est réalisée. Le culot est ensuite lavé successivement avec de l'éthanol 70% et 95%. Le culot est resuspendu dans 100 à 200 μ L de TER (20 μ L RNase ; 180 μ L TE « 10 mM Tris ; 1 mM EDTA ») et stocké à - 20°C.

5. 2- Extraction des ARN totaux au phénol chaud

La méthode adaptée de celle de (Verwoerd *et al.*, 1989) est basée sur la séparation des molécules en fonction de leur polarité selon la nature des différents solvants.

Une solution composée de ½v de tampon de lyse (Tris 100 mM pH 8 ; EDTA 10 mM pH 8 ; LiCl 0,1 M et SDS 1%) et ½v de phénol est incubée à 80°C. Dans des tubes sont placés l'équivalent de 50 à 150mg de poudre d'embryon ou 1,5 à 2 g de poudre d'albumen. La solution Tampon/phénol chaud, 500 μ L pour l'embryon 10 ml pour l'albumen, est ajoutée très rapidement afin que la poudre ne décongèle pas. Il est important que le tampon ne gèle pas au contact du tube. Les tubes sont agités à l'aide d'un vortex pendant 30s. Une solution de chloroforme/alcool isoamylique (24/1 : v/v) est ajoutée à l'ensemble à raison de 250 μ L pour les embryons et 5 mL pour les albumens. Le tout est agité pendant 30s. Les tubes sont mis à centrifuger 5 min à 23000g. Après la centrifugation, le surnageant est soigneusement prélevé et mis dans un volume de LiCl 4 M. Cette étape a pour but de précipiter les ARN

pendant une nuit. Suite à la précipitation, le culot est repris dans 250 µl d'eau traitée au DEPC. Les ARN sont précipités avec 1/10 acétate de sodium 3 M pH5,2 et 2,5 v d'éthanol 100% pendant 15 min à -80°C. Cette étape est suivie d'une centrifugation de 10 min à 23000 g. Le culot est lavé à l'éthanol 70%. Après une centrifugation de 5 min à 23000 g le surnageant est éliminé. Le culot est séché 5 min sous vide et repris dans 50 µL d'eau. Les solutions d'ARN obtenues sont conservées à - 80°C.

5. 3- Purification des ARNm

Les ARNm sont purifiés à partir des ARN totaux grâce au kit PolyAtract SystèmeIV. 0,1 à 1 mg d'ARN totaux sont chauffés à 65°C pendant 10 min puis hybridés avec la sonde d'oligo(dT) biotinylé en présence de SSC 20 X (NaCl 3M ; citrate trisodique 0,3M pH 7,2) pendant 10 min à température ambiante. Le mélange est mis dans des tubes avec des particules de streptavidine préalablement lavées avec du SSC 0,5 X. Les tubes sont déposés sur un portoir aimanté. Les ARN ne possédant pas de queue polyA ne s'accrochent pas sur les particules de streptavidine et ne sont donc pas retenus par l'aimant. Le surnageant est éliminé. Après trois lavages au SSC 0,1 X, les ARNm sont élués dans 200µL d'eau DEPC. Les ARNm sont ensuite précipités par de l'acétate de sodium (1/10 : v/v) et de l'éthanol à 95% (2/1 : v/v) en présence de 2 µl de glycogène puis conservés à - 20°C.

5. 4- Dosage des acides nucléiques

5. 4. 1- Spectrophotométrie

Le dosage des acides nucléiques est effectué en mesurant l'absorbance à 260 nm. A cette longueur d'onde, une unité d'absorbance correspond à une concentration de 50 µg/ml d'ADN ou 40 µg/ml d'ARN. Il est également possible de déterminer la pureté des échantillons en mesurant le rapport d'absorbance 260 nm / 280 nm, qui doit être supérieur à 1,8 pour l'ADN et 2 pour l'ARN.

5. 4. 2- Fluorimétrie

Les ADN génomiques ou plasmidiques peuvent être dosés par fluorimétrie grâce au réactif de Hoeschst (bisbenzimidazole). Le réactif de Hoeschst forme un complexe avec l'ADN qui absorbe la lumière à 350 nm (longueur d'onde d'excitation) et la restitue à 450 nm (longueur d'onde d'émission) proportionnellement à la quantité d'ADN en solution. La solution de Hoeschst est préparée le jour même à la concentration de 1 µg/ml final dans du tampon TNE (Tris-HCl 10 mM, pH 7,4 ; NaCl 0,2 M ; EDTA 1 mM). Le fluorimètre (TD-700 Laboratory Fluorometer, Turner Designs) est calibré avec une concentration d'ADN plasmidique connue.

5. 5- Reverse Transcription

L'obtention d'ADNc s'effectue à partir d'ARN totaux grâce à une transcriptase inverse (RT). Il est nécessaire de commencer par une étape d'hydrolyse d'ADN génomique afin d'éviter les contaminations. Un µg d'ARN additionné de tampon RT Promega (1X), de MgCl₂ (1,6 mM) et de DNase (0,06 U.µl⁻¹) est placé pendant 30 min à 37°C puis 5 min à 80°C. Pour l'étape de transcription inverse, 15µl de RT-mix (Tampon RT promega 1X ; dNTP 1 mM ; Oligo(dT)₁₅ Promega 6,6 µM ; Reverse Transcriptase Promega 13 U.µl⁻¹) sont ajoutés au mélange puis l'ensemble est placé pendant 1 h à 42°C puis 10 min à 80°C.

5. 6- PCR

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) amplifie une séquence d'ADN cible à l'aide d'un couple d'amorces, correspondant à une séquence d'oligonucléotides et d'une enzyme la Taq ADN polymérase. Cette amplification se déroule en trois phases : la dénaturation (les brins d'ADN se séparent) l'hybridation (le couple d'amorces s'accroche à l'ADN cible) et l'élongation (synthèse du brin complémentaire d'ADN).

Les amorces utilisées au cours des différentes PCR sont répertoriées tableau n°III

Tableau III : Liste des amorces utilisées. E : efficacité des amorces R² : pente de la droite des tests de dilutions.

nom	Séquences (5'-3')		Expérience
	E	R ²	
18S	CGT CCC TGCCCTTTGTACAC ACACTTCACCGGACCATTCAA	1.18 0.99	Qt-RT-PCR Chapitre I
Ask1	CAG TGA GGC AAA ACA GTG TGT TC CAG CTT CCA ACA AGA AAC CAT TC	1.24 0.98	
Ask2	TGG GTC CAG GCG TGT TAT CT TGC CCA TGC CGT TCA TG	0.99 0.97	
Akh1	TGG TGC CCC CTC GTA GTC T AAC CAG TAG TAG AGC AGC AAC ACA A	1.04 0.99	
Akh2	GGA AAT AAT GCC TCT AGC GTA TGT C GGT ACG ATA ATT CAT TTG CAT CAT G	0.82 0.97	
Akh1	ACT AAG GA CCA GCC GC GGC TCC TGA CGG ATT CA		
Ask2 GPS1 GPS2 UMP	ACA GTT GGA ATT ATA TCA CAG GC TAT CGA AAT GTG GAG CAA TCG TC CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C		3'RACE et 5'RACE
M13	CAG GAA ACA GCT ATG ACC GTA AAA CGA CGG CCA C		PCR sur colonie bactérienne transformée par vecteur pCR 2.1 Topo Chapitre II
ask2F334	CGT AGA AGC CCT TCA TCA G AGC TCA GAC TGT GGT GTC T		Génotypage F2/F334 Chapitre II

PCR des gènes cibles

Dans un tube est déposé 2 µl d'ADNc ou des colonies de bactéries additionnés de 2,5 µl de Tampon Promega 10X, de MgCl₂ 2,5 mM, de dNTP 0,1 mM, de chaque amorce 20 µM et d'enzyme Taq ADN polymérase Promega 5 U/µL. Le mélange est mis dans un thermocycleur Biorad programmé en fonction des amorces :

Amorces (18s, ask1, ask2, akh1, akh2)

Dénaturation à 94°C	2 min		
Dénaturation à 94°C	1 min	} x 35 cycles	
Hybridation à 55°C	1 min		
Elongation à 72°C	1 min		
Elongation à 72°C	7 min		

Amorce (M13) pour les PCR sur colonies Bactériennes

Dénaturation à 94°C 30 s	}	x 35 cycles
Hybridation à 55 °C 30 s		
Elongation à 72°C 30 s		

PCR des microsatellites

L'amplification des microsatellites est réalisée au sein du laboratoire de l'UR Génétique et Amélioration des Plantes, de l'INRA, Estrées-Mons, suivant le protocole couramment utilisé sur place.

Dans un tube est déposé 1/40 d'ADN génomique additionné de Tampon [(NH₄)₂SO₄ 1 M, Tris-HCl (pH 8,8) Tween-20 10%], de MgCl₂ 25 mM, de dNTP 10 mM, de chaque amorce 20 µM et d'enzyme Taq ADN polymérase 5 U/µL. Le mélange est mis dans un thermocycleur programmé comme suit :

Dénaturation à 94°C	2 min		
Dénaturation à 94°C	45 s	}	x 35 cycles
Hybridation à 56°C	45 s		
Elongation à 72°C	1 min		
Elongation à 72°C	7 min		

5. 7- qt-RT-PCR

5. 7. 1- Principe

La qt-RT-PCR est réalisée sur l'appareil ABI PRISM 7000 Sequence detection System (Applied Biosystems). L'appareil est composé d'un thermocycleur couplé à un microspectrofluorimètre et d'un ordinateur qui permet l'acquisition des données. La détection des produits d'amplification est réalisée par mesure de fluorescence grâce au

SYBR Green. Ce dernier est un fluorophore capable de se lier à l'ADN double brin. Il est fluorescent lorsqu'il est lié à l'ADN alors qu'il ne fluoresce pas sous forme libre. Les résultats obtenus correspondent à la fluorescence mesurée au cours des cycles de PCR. L'ordinateur détermine une valeur appelée Ct (Cycle threshold), correspondant au nombre de cycles nécessaire pour atteindre une valeur seuil de fluorescence. Le Ct est inversement proportionnel à la quantité d'ADNc matrice.

5. 7. 2- Protocole

Dans un puits, 3,5 µl d'ADNc sont déposés avec 300nM d'amorces et 12,5 µl de SYBR Green PCR Master Mix 2X (Applied Biosystems), dans un volume final de 25 µl. Une plaque pouvant contenir jusqu'à 96 échantillons, est placée dans l'appareil programmé pour 2 min à 50°C (élimination des produits PCR contaminant); 10 min à 95°C (activation de la polymérase) suivi de 40 cycles d'amplification. Chaque cycle d'amplification se compose d'une étape de 15 s à 95°C suivie d'une étape d'1 min à 60°C. Trois répétitions sont effectuées lors de cette étude. A partir de ces répétitions, la moyenne et l'écart type sont calculés. A chaque cycle de PCR la quantité d'ADNc double. Le CT déterminé par l'ordinateur est inversement proportionnel à la quantité d'ADNc ce qui permet d'utiliser la formule :

$$[\text{ARNm cible}]_{\text{Unité Arbitraire}} = 1 / 2^{\text{CT}} \times 10^{11}$$

5. 7. 3- Amorces

La détermination des amorces pour la qt-RT-PCR s'est effectuée grâce à un logiciel : Primer Express Software v2.0. Ce logiciel permet d'analyser et de définir des séquences d'oligonucléotides en fonction de leurs applications en PCR. Le logiciel définit des amorces en prenant en compte le Tm (melting temperature, correspondant à la température de demi-hybridation des brins d'acides nucléiques) la longueur du produit d'amplification, les possibilités de dimérisation des amorces entre elles et la zone de fixation des amorces par rapport à la séquence donnée.

Préalablement des alignements entre les différents gènes sont effectués pour définir des amorces spécifiques de chaque séquence.

Pour chaque gène, un couple d'amorces est défini. Dans tous les cas, la taille du produit d'amplification est assez petite, de soixante à une centaine de paires de bases et le T_m est d'environ 60°C.

5. 8- Electrophorèse

Le gel d'électrophorèse permet de séparer les molécules d'acides nucléiques linéaires en fonction de leur taille en les soumettant à un champ électrique. Les acides nucléiques, chargés négativement, migrent de la cathode vers l'anode. Le distance de migration est proportionnelle à la taille des fragments.

5. 8. 1- Electrophorèse sur gel d'agarose

Le gel est réalisé à partir d'agarose (1 à 2% p/v) dissout dans du TBE 1X (Tris-base 45 mM ; acide borique 45 mM ; EDTA 1 mM). La concentration du gel est adaptée à la taille des fragments à séparer (Sambrook J *et al.*, 1989).

Le produit issu de la PCR (gène cible) est additionné de 1/10 de volume de tampon de charge (glycerol 30% ; bleu de bromophénol 0,25% ; xylène cyanol 0,25%). Le tampon de charge permet le maintien du dépôt en immersion et la visualisation de la migration.

La taille des fragments est déterminée par comparaison de leur distance de migration avec celui du Ladder (mélange de fragments de taille connue).

La migration est effectuée sous une tension de 100 V dans du tampon TBE 1X. Après l'électrophorèse, le gel est plongé dans une solution de bromure d'éthidium (Bet) à 0,5 µg/ml. Le Bet s'intercale entre les bases des acides nucléiques et les rend visibles sous rayonnement UV (310 nm).

5. 8. 2- Electrophorèse sur gel d'agarose Metaphor®

L'agarose Metaphor® est utilisé afin de séparer les fragments de tailles très proches. Dans le but de visualiser les petites différences de tailles entre les microsatellites, on utilise un gel à 3% d'agarose Metaphor® dissout dans du tampon TBE 1X (Tris-base 45

mM, acide borique 45 mM, EDTA 1 mM) additionné de Bet à 1 µg/ml. Le gel est coulé dans des cuves Fisher 25*30 cm qui sont ensuite immergées dans du tampon TBE 1X.

Le produit issu de la PCR (microsatellite) est additionné de 1/10 de volume de tampon de charge (formamide désionisée 98% : v/v ; EDTA 10 mM pH 8 ; bleu de bromophénol 0,1% : v/v ; xylène cyanol 0,1% : p/v) afin d'être déposé sur le gel et de subir une migration de 3h30 min à 140 V. La lecture du gel est réalisée grâce à l'appareil Gel doc 2000 Biorad® assisté par le logiciel Quantity one.

6- Clonage de fragments

Dans le but de trouver du polymorphisme entre les séquences d'aspartate kinase chez les lignées F2 et F334, des fragments d'aspartate kinase ont été clonés et séquencés.

6. 1- RACE PCR

6. 1. 1- 3'RACE et 5'RACE

La 3'RACE et la 5'RACE (Rapid Amplification of cDNAs Ends) permet d'amplifier les extrémités 3'et 5'd'un ADNc. La RT est réalisée avec l'amorce oligo-d(T) spécifique qui s'hybride avec l'extrémité polyA des ARNm et une séquence adaptatrice en 5' la SMART II (Switching Mechanism At 5' end of RNA Transcript) riche en dG.

La RT est réalisée en mettant en présence de 1 µl ARNm et 1 µl de 3'CDS pour la 3'RACE primer et de 1 µl d'ARNm, 1 µl de 5'CDS primer et 1 µl de SMART II A oligo pour la 5'RACE dans un volume final de 5 µl. Le mélange est agité et placé 2 min à 70°C puis 4 min à 4°C. Une solution comprenant (2 µl de tampon 5X First-strand ; 1 µl de DTT 20 mM, 1 µl de dNTP 10 mM et 1 µl d'enzyme Power-script reverse transcriptase) est ajoutée au mélange. Le tout est placé pendant 1 h 30 min à 42°C puis est dilué dans 100 à

150 µl de tampon Tricine EDTA. Une dernière étape de 7 min à 72°C est réalisée avant de pouvoir stocker le mélange à -20°C en attente des PCR.

6. 1. 2- Amplification des fragments spécifiques

L'amplification des fragments spécifiques est réalisée sur des 5'RACE et 3'RACE synthétisées à partir des ARNm issus des lignées F2 et F334.

La composition des solutions pour les PCR sont les suivantes :

2,5 µl 5'RACE	2,5 µl 3'RACE
5 µl UMP (amorce universelle)	5 µl UMP (amorce universelle)
1 µl GSP1 (amorce spécifique du gène)	1 µl GSP2 (amorce spécifique du gène)
41,5 µl Master Mix	41,5 µl Master Mix

Le Master Mix est composé de 5 µl de Tampon avantage 2 PCR 10 X; 1 µl de dNTP et 1 µl d'enzyme avantage polymérase. Le mélange est placé dans un thermocycleur afin de subir 40 cycles d'amplification qui se composent d'une étape de 1 min à 94°C suivie d'une étape d'1 min à 65°C et 3 min à 72°C.

6. 2- Préparation de l'insert

Après électrophorèse sur gel d'agarose du produit issu de la RACE PCR, la bande d'agarose contenant le fragment d'ADN sélectionné est découpé au scalpel sous lampe UV et transféré dans un tube. L'ADN est purifié avec le kit Qiaquick Gel (QIAGEN) suivant les instructions du fournisseur. L'ADN est ensuite élué dans de l'eau.

6. 3- Vecteur

Le vecteur pCR®2.1-TOPO® (fig. n°13) de 3,9 kb possède trois séquences permettant la sélection des clones recombinants :

-deux gènes conférant aux bactéries transformées la résistance à la kanamycine ou à l'ampicilline.

-un gène *lacZ* codant pour une sous-unité de la β -galactosidase permettant de différencier les bactéries transformées par un plasmide recombinant ou non recombinant.

Le vecteur possède également une Topoisomérase fixé au vecteur qui permet de manière efficace la ligation du produit PCR avec le vecteur. La ligation est effectuée en mettant en présence 4 μ l du fragment purifié, 1 μ l de solution fournie (pour la transformation bactérienne par électroporation cette solution est diluée quatre fois) et 1 μ l du vecteur pCR®2.1-TOPO® dans un volume final de 5 μ l durant 10 min à température ambiante.

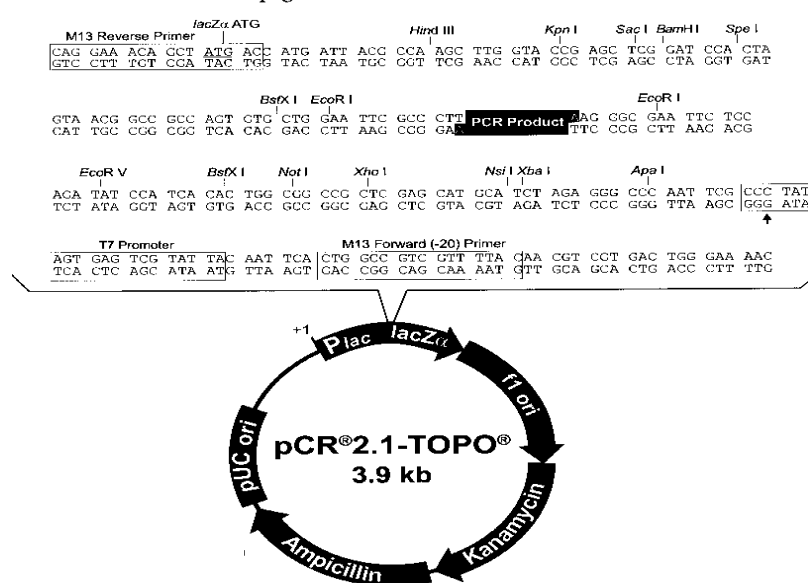


Figure 13 : Carte du vecteur pCR® 2.1 TOPO. (invitrogen). Une partie de la séquence est présentée ainsi que le site de clonage

6. 4- Transformation bactérienne

La transformation des bactéries par les produits de ligation est réalisée soit par choc thermique soit par électroporation.

Transformation par choc thermique : 100 µL de cellules chimiocompétentes (One Shot® TOP10 chemical *E.coli*) et 2 µL des produits de ligation sont incubés pendant 30 min dans la glace. Le choc thermique est effectué en plongeant le mélange pendant 30s dans un bain-marie à 42°C puis en le refroidissant immédiatement dans la glace pendant 2 min. 250 µl de milieu SOC sont ajoutés, les bactéries sont incubées pendant 1h à 37°C sous légère agitation.

Transformation par électroporation : 100 µL de cellules électrocompétentes (One Shot® TOP10 Electrocomp™ *E.coli*) et 2 µL des produits de ligation sont transférés dans une cuve à électroporation de 1 mm et incubés dans la glace. Une décharge électrique de 2,5 kV est appliquée pendant 5 millisecondes à la cuve au moyen d'un électroporateur (Pulse controller plus Biorad). 250 µl de milieu SOC sont ajoutés et le mélange est incubé pendant 1h à 37°C sous agitation douce.

De 50 à 150µL de la suspension bactérienne issue de la transformation par choc thermique ou par électroporation sont étalés sur boîte de Petri contenant du milieu LB gélosé, de l'ampicilline et 40 µl de 5-bromo-4 chloro -3 indoyl β-D-galactopyranoside (Xgal) et 4 µL de l'isopropyl-β-Dthio galactopyranoside (IPTG) . Les boîtes sont incubées à 37°C pendant une nuit. Pendant cette période d'incubation, seules les bactéries transformées résistantes à l'ampicilline peuvent se développer. En présence d'IPTG, inducteur du gène LacZ, la β-galactosidase est produite et hydrolyse le composé incolore Xgal en un composé bleu le bromo-chloro-indole. L'insertion du fragment s'effectue au niveau du gène LacZ. Les bactéries ayant intégré le plasmide recombiné ont le gène LacZ éteint donc elles sont blanches alors que les bactéries ayant intégré le plasmide sans insert sont bleues. Les bactéries blanches sont analysées par PCR afin de vérifier la taille de l'insert. Les bactéries ayant intégrées la bonne taille d'insert, sont mises en culture dans 5 ml de milieu LB et ampicilline sous agitation pendant une nuit à 37°C.

Les plasmides, purifiés avec le kit Qiagen® Plasmid Purification (QIAGEN), sont envoyés à une entreprise pour être séquencés.

7- Extraction et étude de l'aspartate kinase

7. 1- Extraction de l'aspartate kinase

L'extraction est réalisée suivant le protocole (Dotson *et al.*, 1989). Cinq à 10 g de feuilles ou de grains sont broyés avec du Tampon A [(Tris-HCl 50 mM pH 7,4 ; KCl 50 mM ; Lys 2 mM ; Thr 2 mM ; DTT 3 mM ; phénylméthylsulfonylfluoride (PMSF) 0,1 mM ; EDTA 1 mM ; glycerol 15% : v/v ; polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) 5% : p/v], puis le mélange est centrifugé 30 min à 12000 g. Le surnageant est filtré sur Miracloth. Une solution de (NH₄)₂SO₄ 10% est ajoutée graduellement et le mélange est agité pendant 30 min. Après une centrifugation de 30 min à 12000 g, le surnageant est déposé sur colonne PhenylSepharose CL4B, équilibrée avec le Tampon B (Tris-HCl 50 mM pH 7,4 ; KCl 50 mM ; EDTA 1 mM ; DTT 3 mM ; (NH₄)₂SO₄ 10%). Le lavage de la colonne est effectué avec le Tampon C (Tris-HCl 50 mM pH 7,4 ; KCL 50 mM ; EDTA 1 mM ; DTT 3 mM ; (NH₄)₂SO₄ 7,5%). Les aspartate kinases sont éluées par le Tampon D (Tris-HCl 50 mM pH 7,4 ; KCl 50 mM ; EDTA 1 mM ; DTT 3 mM ; éthylène glycol 50% : v/v). Les enzymes sont précipitées avec 1,5 v de (NH₄)₂SO₄ 100%, puis sont centrifugées 40 min à 20000 g. Le culot est repris dans du Tampon E. (Tris HCl 50mM pH 7.4 ; KCl 50mM ; EDTA 3mM ; Glycérol 15%).

7. 2- Dosage de l'activité Aspartate kinase

La méthode d'hydroxamate, décrit par Azevedo *et al.* (1992), est basée sur le dosage du produit de la réaction catalysée par l'aspartate kinase.



Une solution d'hydroxamate (500µl) (Asp sodium salt 50 mM ; Tris-HCl 20 mM pH 7,4 ; DTT 1 mM ; glycérol 3% ; MgSO₄ 8 mM ; ATP 2 mM ; Hydroxylamine 480 mM) et 100µl d'enzyme sont incubés 60 min à 37°C. Une solution stop (500 µl) (FeCl₃ 0,67 mM ; HCl 0,5 mM ; TCA 20%) est ajoutée au mélange afin d'arrêter la réaction. Une centrifugation légère est réalisée avant la lecture d'absorbance à 540 nm. Le blanc est réalisé avec 500µl de solution (Tris HCl 20mM pH 7.5 ; DTT 1mM ; Glycérol 3% ; MgSO₄ 8mM ; ATP 2mM ; Hydroxylamine 480mM) 100µl d'enzyme et 500 µl de solution stop, l'Asp (sodium salt) 50mM est ajouté au moment du dosage.

L'absorbance lue à 540 nm est comparée à celle d'une gamme de L-aspartate β-hydroxamate, ce qui permet d'évaluer la quantité de produit formé par unité de temps.

8- Etude des acides aminés

8. 1- Extraction d'acides aminés

Les acides aminés sont extraits de la poudre d'embryon de maïs par la méthode hydroalcoolique (Glevarec *et al.*, 2004; Vincent *et al.*, 1997). Un volume de poudre et 2 volumes d'éthanol 96% froid sont mis à agiter pendant une heure à 4°C. Après une centrifugation de 15 min à 11000 g, le surnageant est récupéré (étape1). Le culot, repris dans 2 volumes d'eau, est agité pendant 1h à 4°C, puis centrifugé 15 min à 11000 g (étape2). Les deux surnageants issus de l'étape 1 et 2 sont rassemblés et constituent la solution hydroalcoolique d'acides aminés. L'extrait hydroalcoolique est purifié par l'action du chloroforme et un passage sur colonne Dowex 50WX8 (200–400 mesh, H-form resin; Supelco, Bellefonte, PA, USA) afin d'être utilisé en HPLC et GCMS-HRSIM

8. 2- Dosage des acides aminés totaux par la méthode de Rosen

La teneur en acides aminés totaux est déterminée selon une méthode colorimétrique (Rosen, 1957) en utilisant la glutamine comme acide aminé de référence. La méthode est

basée sur la réaction des groupements α -aminés avec la ninhydrine, réduite par une solution de KCN.

Dans un tube, 1 v d'extrait hydroalcoolique, 9 v d'eau et 5 v de KCN 2% dans du tampon acétate et 5 v de ninhydrine 3% sont agités à l'aide d'un vortex. Le tube est mis à incuber pendant 15 min à 100°C dans un bain-marie. La réaction est stoppée par ajout de 5ml d'isopropanol-eau (1/1 : v/v). L'absorbance lue à 570 nm est comparée à celle d'une gamme de glutamine, ce qui permet d'évaluer la quantité d'acides aminés contenus dans les extraits.

8. 3- Dosage des acides aminés par chromatographie

8. 3. 1- Principe de la Chromatographie

La chromatographie est une méthode de séparation des constituants d'un mélange même très complexe. Le mélange à séparer est injecté dans la colonne (phase stationnaire), dilué dans la phase mobile et entraîné à travers la colonne. Dans des conditions de chromatographie donnée, le "temps de rétention" (temps au bout duquel un composé est élué de la colonne), caractérise qualitativement une substance. Un détecteur, placé à la sortie de la colonne, permet d'identifier le temps de rétention de chaque composé, mais aussi leur concentration. La détection se présente sous forme d'un chromatogramme (fig. n°14) ; l'abscisse indique le temps de rétention donc la nature du soluté alors que l'amplitude, l'aire et la ligne de base des pics permettent de mesurer la concentration de chaque soluté dans le mélange injecté.

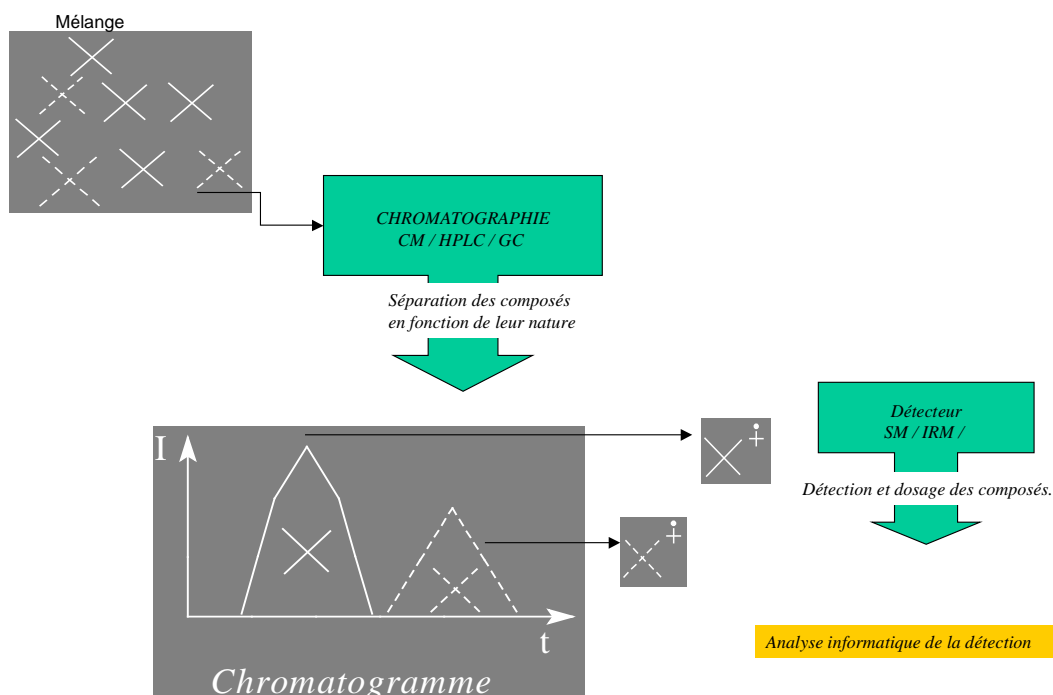


Figure 14 : Principe de la chromatographie. Un mélange de composés est soumis à une chromatographie (de type CM, chromatographie en couche mince, HPLC chromatographie liquide haute performance ou GC chromatographie en phase gazeuse) de manière à séparer chacun des composés en fonction de leur nature.

8. 3. 2- Chromatographie Liquide Haute Performance

L'HPLC (fig. n°15) est une chromatographie où les deux phases (mobile et stationnaire) sont liquides. Le principe est basé sur l'affinité des composés à analyser pour l'une ou l'autre des phases (éluants).

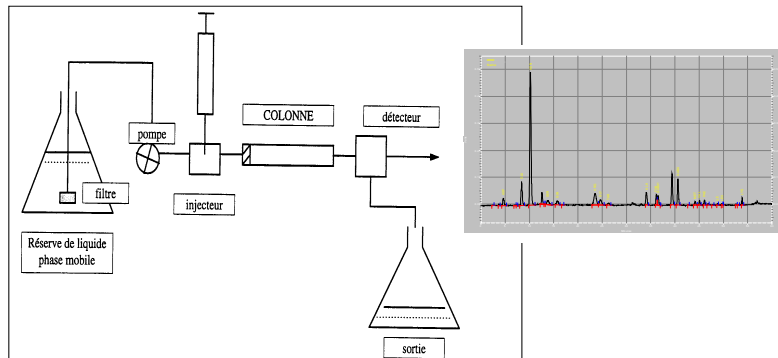


Figure 15 : Schéma d'une chromatographie liquide haute performance. L'échantillon est introduit au niveau de l'injecteur, puis les composés sont séparés lors de leurs passages dans la colonne.

Protocole

Le dosage des acides aminés en HPLC a été effectué au Laboratoire de l'UMR INRA 950 de Physiologie et Biochimie Végétales de l'université de Caen en collaboration avec le Pr Jean-Bernard Cliquet. Les acides aminés sont dérivés par l'o-phthaldialdéhyde ; le produit issu de cette réaction est fluorescent et peut être dosé par spectrofluorimètre. Le dosage des acides aminés est réalisé grâce un standard externe [mélange commercial de 18 acides aminés (2,5 mM), Gln (2,5 mM), Asn (2,5 mM) et GABA (2,5 mM)] et un standard interne (ABA 2,5mM). Chaque échantillon est injecté avec 75 µl de standard interne. L'HPLC est programmé afin d'obtenir une variation des proportions des deux éluants 100% à 0% d'éluant A [Na-acétate anhydre 50mM, pH 5.9, Méthanol (1/5 : v/v), Tétrahydrofur (1/10 : v/v)] et 0% à 100% d'éluant B (méthanol 100%) en 1h, ce qui permet la séparation des composés. L'appareil est programmé comme suit :

0% méthanol à 4% méthanol en 7 min

4% méthanol à 62% méthanol en 30 min

62% méthanol à 100% méthanol en 5 min

100% méthanol à 0% méthanol en 2 min

8. 4- Dosage des acides aminés marqués au ^{15}N par GC-MS

Dans notre étude, l'aspartate marqué au ^{15}N (99% atome en excès) est utilisé afin de suivre sa dégradation en ses différents acides aminés dérivés (lysine, méthionine, thréonine) (fig. n°16). La spectrométrie de masse permet l'évaluation du rapport $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ dans les acides aminés séparés par chromatographie en phase gazeuse. L'analyse en GC-MS-HRSIM a été réalisée au laboratoire du Service Commun d'Analyses Spectroscopiques (SCAS) de l'université d'Angers en collaboration avec David Rondeau et Sylvie Fournier.

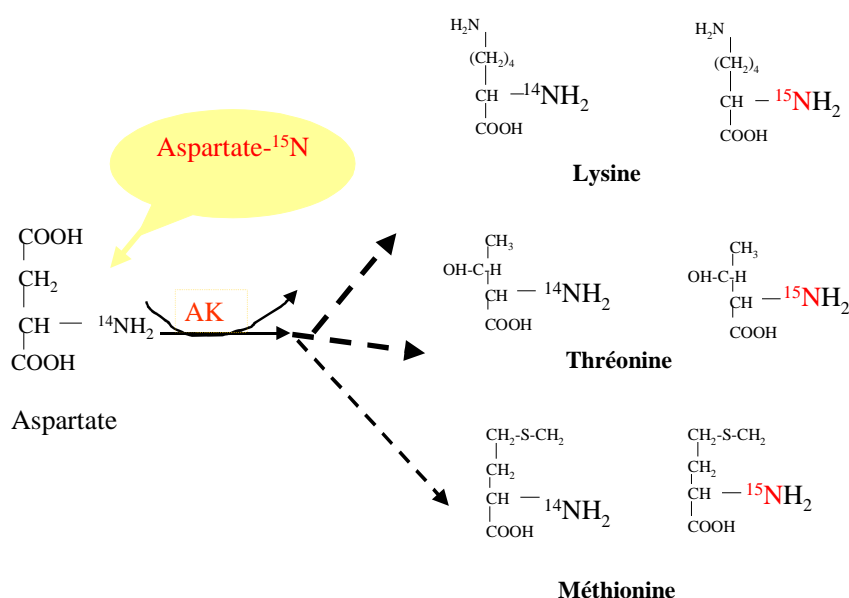


Figure 16 : Principe du marquage isotopique. L'aspartate- ^{15}N est fourni en excès. Le suivi de l'évolution du rapport $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$, à travers les acides aminés, donne une indication sur l'activité de l'aspartate kinase et sur le devenir du groupement amine de l'aspartate dans les différents métabolites.

8. 4. 1- Principe de la chromatographie gazeuse

Le principe de la chromatographie gazeuse est une chromatographie où le mélange à analyser est vaporisé à l'entrée de la colonne et véhiculé dans la colonne par une phase mobile gazeuse.

8. 4. 2- Principe de la Spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse (fig. n°17) consiste à ioniser par des électrons une molécule A qui devient A^+ . L'entité A^+ va se scinder en plusieurs entités plus ou moins chargées ou plus petites. Ces entités sont accélérées, par un champ électrique, puis déviées par un champ magnétique. La déviation des entités est proportionnelle à la masse sur la charge (m/z).

Le détecteur informatisé à la sortie de la chambre magnétique permet d'obtenir directement un spectre. Pour un composé A, le spectre est composé d'un pic important (le pic de base de l'ion moléculaire) accompagné de petits pics (dus à des arrangements moléculaires) et des pics de masse moléculaire $M+1$ et $M+2$ provenant des isotopes du carbone, de l'azote, de l'oxygène....

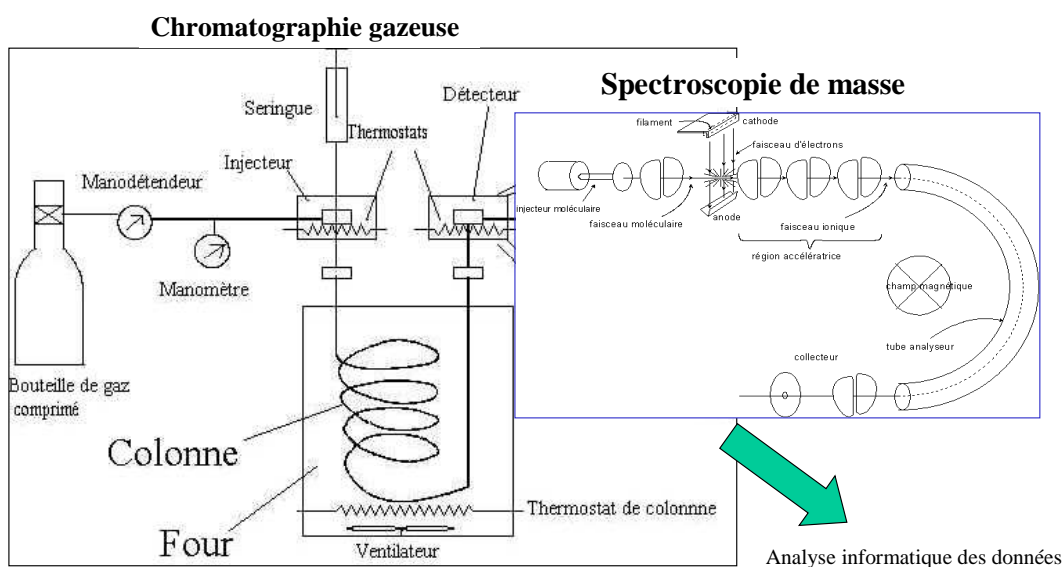
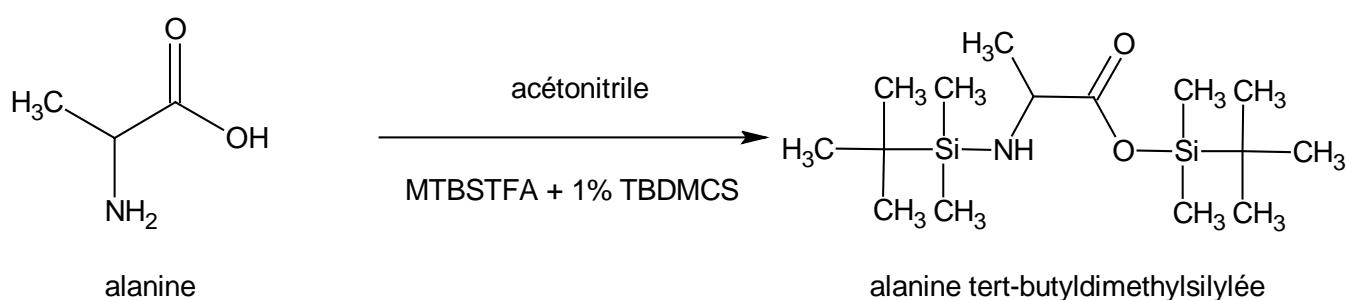


Figure 17 : Schéma d'une chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse. L'échantillon est introduit au niveau de l'injecteur et immédiatement vaporisé, ensuite les composés gazeux sont séparés lors de leurs passages dans la colonne. En sortie de colonne, chaque composé subit une accélération. Lors de son passage dans le champ magnétique chaque composé est dévié en fonction de sa taille et de sa charge ce qui permet son identification en spectrométrie de masse.

8. 4. 3- Protocole

Les acides aminés sont dérivés par 100 µl d'acétonitrile et 100 µl de N-méthyl-N-(tert-butyl-diméthylsilyl)-trifluoroacétamide-1%tert-butylchlorodiméthylsilane (MTBSTFA + 1% TBDMCS) pendant 30 min à 90°C (Rhodes *et al.*, 1989). La dérivation permet la détection des acides aminés par le spectromètre de masse après la perte d'un groupement tertio-butyle.



Un µl de produit dérivé est injecté dans l'appareil à chromatographie gazeuse couplé à une spectrométrie de masse [JMS 700 Jeol, Japon, équipé d'une colonne (30m * 0.25mm * 0.25µm) impact d'ionisation (70eV), acquisition des données (HRSIM)] qui sépare les différents acides aminés du mélange et mesure leur masse avec précision tel qu'il est possible de faire la différence entre deux composés identiques de forme isotopique différente.

9- Cartographie des loci contrôlant des caractères quantitatifs

De nombreux caractères d'intérêt agronomique résultent de l'action de nombreux gènes à effets inégaux et influencés par l'environnement ; ils sont dits polygéniques ou quantitatifs. La distribution de la valeur d'un caractère quantitatif dans une population est continue. Le QTL « Quantitative Trait Loci » correspond à la cartographie des loci contrôlant un caractère à déterminisme génétique complexe. Pour identifier les QTLs, il est nécessaire d'avoir une descendance en ségrégation et une carte génétique saturée de

marqueurs moléculaires, afin de faire la relation entre la ségrégation du caractère et la ségrégation des marqueurs moléculaires (fig. n°18).

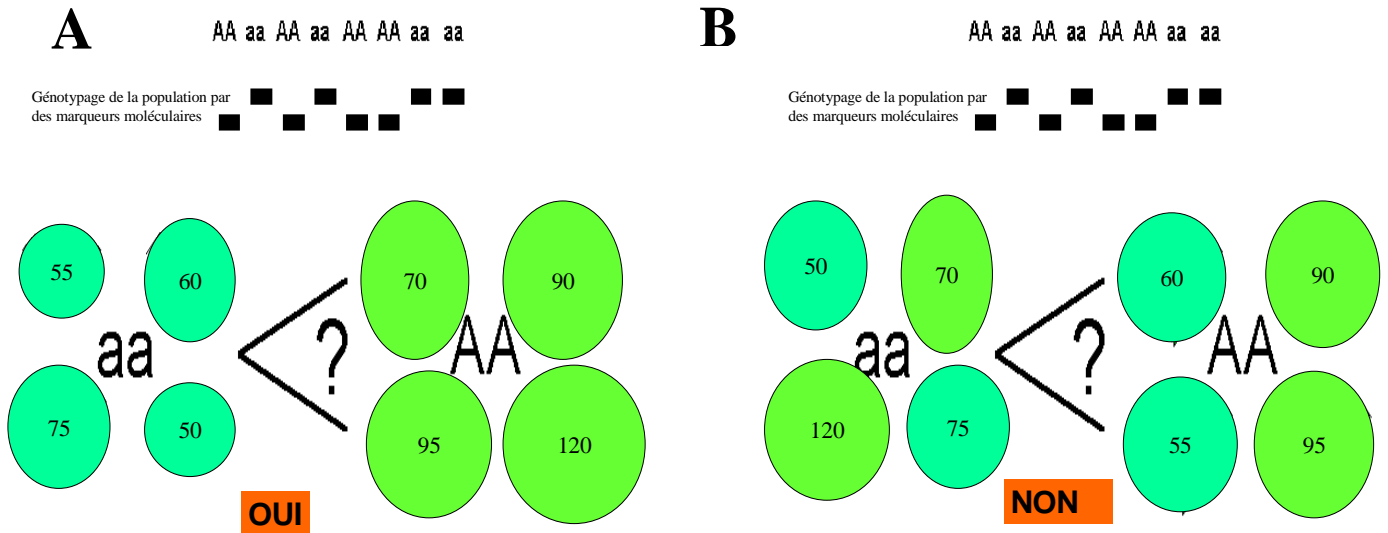


Figure 18 : Principe de l'analyse QTL. L'analyse QTL correspond à la liaison entre le génotype représenté par (AA, Aa, aa), et le phénotype représenté par la valeur numérique du caractère. A. La moyenne des valeurs des individus aa est statistiquement différente de celle des individus AA. Il y a une liaison entre le génotype et la variation du caractère B. La moyenne des valeurs des individus aa n'est pas statistiquement différente de celle des individus AA. il n'y a pas de liaison entre le génotype et la variation du caractère

9. 1- Principe de la recherche de QTL

La recherche de QTLs est une analyse statistique de liaison entre le génotype et le phénotype. Plusieurs méthodes sont couramment utilisées.

L'analyse de variance marqueur par marqueur : c'est un test ANOVA ou régression linéaire qui correspond à la comparaison de la moyenne du groupe des individus ayant le génotype A et la moyenne du groupe des individus ayant le génotype B.

La cartographie de simple intervalle IM : c'est un test de probabilité de présence du QTL qui est effectué non pas à chaque marqueur, mais en tout point du génome. Le logarithme du rapport entre la fonction de vraisemblance dans l'hypothèse de l'existence d'un QTL donné au locus testé et la fonction de vraisemblance dans l'hypothèse de l'absence de QTL est réalisé afin de déterminer le LOD.

La cartographie d'intervalle composite CIM : c'est une combinaison de la cartographie d'intervalle et de la régression. Elle est appliquée aux intervalles de marqueur, un par un, comme la cartographie d'intervalle, en prenant à chaque fois comme cofacteur, dans la régression du phénotype sur le génotype, les marqueurs des QTLs qui sont en dehors de l'intervalle étudié.

9. 2- Carte génétique

La réalisation d'une carte génétique est basée sur le déséquilibre de liaison entre deux loci dans une population en ségrégation. En effet le taux de recombinaison observé entre 2 loci représente la distance qui les sépare. Il est possible de regrouper et d'ordonner l'ensemble des marqueurs moléculaires en calculant les distances qui les séparent deux à deux. Il existe deux formules pour calculer les distances génétiques à partir des taux de recombinaisons, celle d'Haldane (Haldane, 1919) et celle de Kosambi (Kosambi, 1944); ce dernier prend en compte les phénomènes de crossing-over multiples.

La carte génétique est réalisée à partir des 280 génotypes de la génération BC2S1. Aucun logiciel n'est adapté à la construction de carte à partir de cette population ; de ce fait, Christelle Touchard de l'UMR INRA/USTL 1281, stress abiotiques et différenciation des végétaux cultivés, Estrées – Mons, France, qui a réalisé le corps de la carte génétique, a utilisé trois logiciels : **Mapmaker** afin d'assigner et d'ordonner les marqueurs sur les chromosomes (Lander *et al.*, 1987); **Qmap** (gracieusement communiqué par JC. Nelson) pour calculer le taux de recombinaison entre marqueurs et évaluer les LOD scores et **Joinmap3.0** qui permet d'estimer les distances (en Kosambi) entre les marqueurs (Van Ooijen et Voorrips, 2001). A partir de cette carte préalablement réalisée, le gène *ask* de la voie de l'aspartate est positionné en complément des 130 marqueurs microsatellites « simple sequence repeat (SSR) » et des 3 gènes l'O-Acétyl-Sérine Thiol Lyase (OAS-TL) de la voie de biosynthèse de la cystéine, de la GSH synthétase de la voie de biosynthèse du GSH et d'une méthyltransférase putative (herbicide safener binding protein). La représentation de la carte génétique est effectuée grâce au logiciel MapInspect. Ce logiciel permet de comparer et de présenter les cartes génétiques ; il a été développé par le

département des sciences de l'université de Wageningen et est disponible sur Internet : <http://www.dpw.wageningen-ur.nl/pv/pub/MapComp/Index.htm>.

9. 3- La recherche de QTLs

La recherche des QTLs a été effectuée en collaboration avec Catherine Giauffret de l'UR Génétique et Amélioration des Plantes, INRA, Estrées-Mons.

9. 3. 1- Détection des QTLs

Grâce aux données génotypiques et à la carte génétique, la probabilité de présence de chaque génotype (les homozygotes F2 ou F334 et les hétérozygotes) est évaluée tous les 2 cM en utilisant le logiciel Grafgen (Servin *et al.*, 2002). Avec le taux d'homozygote F334 et les données phénotypiques la procédure PROC GLN du logiciel SAS software (version 8.1) 1991 permet de réaliser une régression linéaire (F) tous les 2 cM. La valeur F de la régression linéaire est utilisée pour déterminer le LOD des QTLs à partir de la formule suivante (Knott et Haley, 1992; Lander et Botstein, 1989) :

$$\text{LOD} = 0,217 \times \left[n \times \ln \left[1 + \frac{1}{n-2} \times F \right] \right] \text{ avec } n = \text{nombre de génotype.}$$

Les seuils significatifs ont été déterminés par 500 permutations aléatoires (Churchill et Doerge, 1994; Knott et Haley, 1992). Pour des seuils significatifs de 95%, 90% et 75%, les LODs seuils sont respectivement 2,81 ; 2,54 et 2,04. Les valeurs de LODs représentent la probabilité d'avoir la présence d'un QTL dans la zone. L'intervalle de confiance a été déterminé grâce à la méthode de la décroissance de LOD de 1.

9. 3. 2- Effet des QTLs

L'effet du QTL, exprimé dans l'unité du caractère, correspond à l'effet de substitution d'un allèle parental par l'autre, c'est à dire l'effet de l'allèle provenant du parent F334 dans un fond génétique F2. Il est estimé grâce à une régression linéaire sur les moyennes des classes génotypiques par rapport à la distribution du caractère déterminé au

locus testé (fig. n°19). L'effet du QTL est calculé par le logiciel SAS software (version 8.1) 1991.

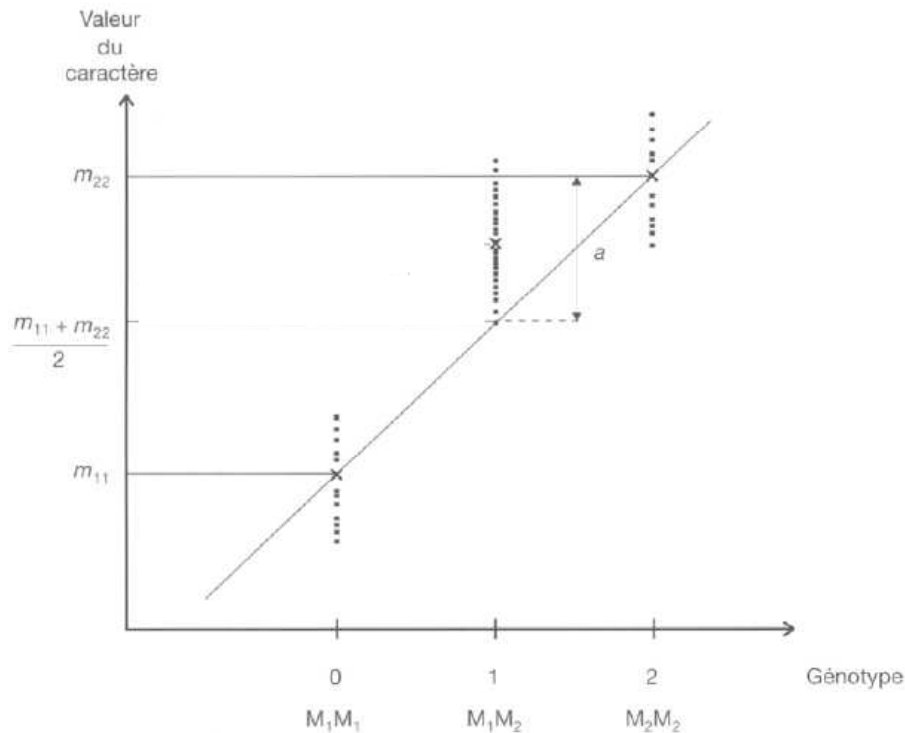


Figure 19 : Effet additif du QTL. L'effet définissant l'action du QTL correspond à la pente (a) de la droite passant par la moyenne des homozygotes M_1M_1 et M_2M_2 . (De vienne et Causse, 1998)

9. 3. 3- R^2 des QTL

Le R^2 représente la contribution du QTL, c'est à dire le pourcentage de variation phénotypique totale exprimé par le QTL. C'est une analyse de variance correspondant à la somme des carrés d'écart du caractère dans la zone QTL sur la somme des carrés d'écart phénotypique totale. Le R^2 est calculé par le logiciel SAS software (version 8.1) 1991.

10- Analyse Bioinformatique

10. 1- Dans l'étude Io x F2

La recherche de gènes candidats dans cette partie est basée sur la liaison entre le métabolisme azoté et les processus métaboliques au cours de la germination et les gènes localisés dans la zone de QTLs.

Trois QTLs, qui expliquent le caractère vitesse de germination entre les lignées Io et F2 du maïs, sont identifiés par Limami *et al.* 2002. Un QTL est localisé sur le chr 2 (entre um16c et umc139) et deux QTLs sur le chr 4 (entre gsy59-ADPG et gsy419) et (entre gsy82 et umc133). Les positions des différents marqueurs, qui délimitent les QTLs, ont été projetées sur les cartes « Pioneer Composite » et « genetic » de <http://www.maizegdb.org>. L'ensemble des gènes, qui se localisent dans la zone des QTLs, est analysé afin de mettre en évidence ceux qui par leur fonction peuvent expliquer la variation du caractère vitesse de germination entre les deux lignées Io et F2. La recherche des séquences des gènes d'intérêt s'est effectuée à l'aide de moteur de recherche spécialisé sur le maïs : <http://www.maizegdb.org> et www.tigr.org en 2003. Certains ADNc sont entièrement séquencés, alors que d'autres ne le sont que partiellement. Ces derniers sont, soit sous forme d'E.S.T. (Express Sequence Tag) correspondant au séquençage partiel d'un ADNc, soit sous forme de T.U.C. (Tentative Unique Contig) correspondant à une séquence artificielle établie à partir de plusieurs E.S.T. chevauchants.

10. 2- Dans l'étude F2 x F334

Dans cette étude, nous cherchons des gènes candidats qui peuvent expliquer la germination dans différentes conditions, les voies communes de signalisation des conditions défavorables, l'effet de l'apport extérieur de lysine.

Jusqu'à présent, la carte génétique de notre population n'est pas publique. A l'aide des marqueurs communs entre les différentes cartes et les travaux de comparaison de cartes effectués par (Falque *et al.*, 2005) il est possible de faire des projections de carte et de positionner sur notre carte les marqueurs et les gènes identifiés dans les autres études. Le

principe de la projection est présenté (fig. n°20). Les calculs sont réalisés à partir des marqueurs encadrant le QTL commun à la carte BCA et les autres cartes (REFMAP, LHRF_Gnp2004 ; IBM_Gnp2004 ; Genetic2005). Les bases de données <http://www.maizegdb.org>; <http://www.infobiogen.fr>; www.genoplante.com sont utilisées afin de localiser, dans l'intervalle des QTLs, les gènes connus et d'identifier ceux qui pourraient intervenir dans le contrôle du caractère.

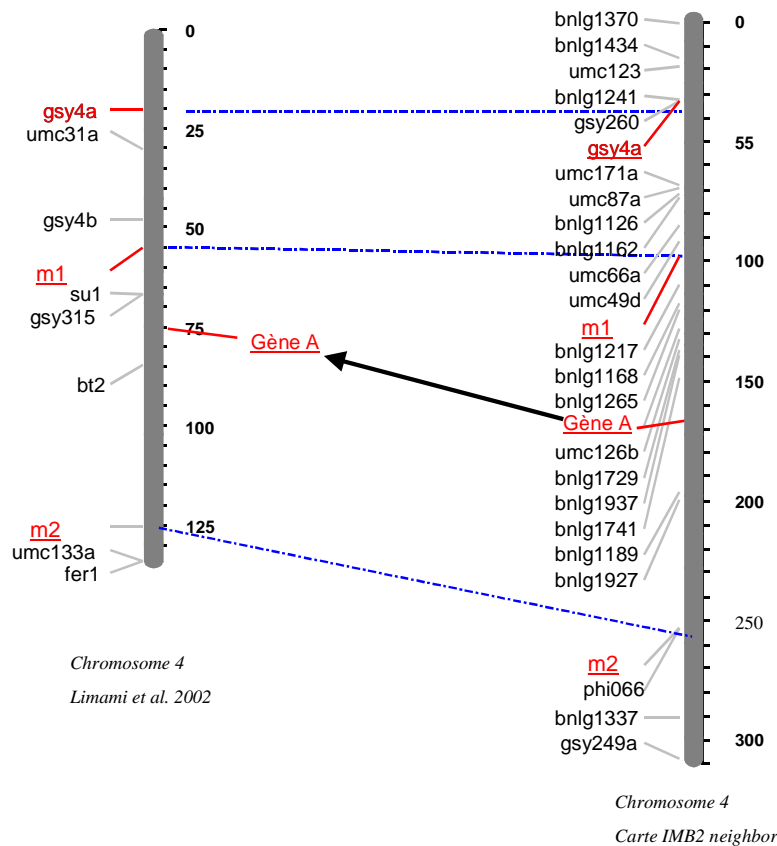
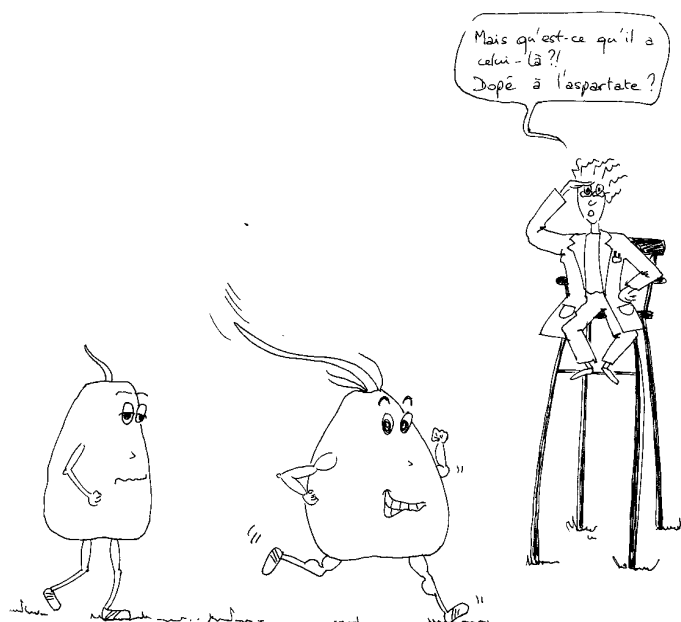
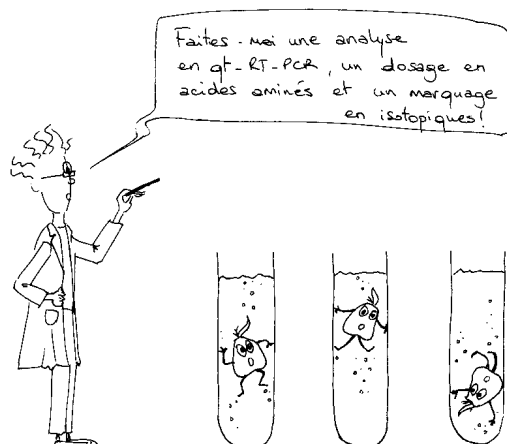


Figure 20 : Principe de la projection de cartes génétiques. La position du gène A est calculée à partir des marqueurs flanquants communs aux deux cartes.



Chapitre I : Caractérisation de la voie de l'aspartate au cours de la germination des deux génotypes Io à germination rapide et F2 à germination lente de maïs (*Zea mays*)



INTRODUCTION

La germination correspond à la reprise du métabolisme nécessaire à la transition de la phase de vie latente de la graine sèche à la phase de développement de la plantule. Cette reprise du métabolisme est principalement orientée vers la mobilisation des réserves azotées et carbonées, indispensable à l'installation et à la croissance de la plantule. Une approche combinant à la fois analyse physiologique et analyse génétique a été utilisée, visant à établir une relation entre le métabolisme azoté et la germination chez le maïs (Limami *et al.*, 2002). L'étude a permis de mettre en évidence une co-localisation entre un QTL de vitesse de germination et un QTL d'activité glutamine synthétase (GS). Le rôle de la GS a été étudié et a révélé que, parmi les cinq gènes de la GS chez le maïs, seuls deux, *gln3* et *gln4*, étaient exprimés au cours de la germination. *Gln4* jouerait le rôle de housekeeping gène avec une expression constitutive dans les différents tissus de la plante tandis que *gln3*, avec une expression transitoire, apparaît spécifique de la germination (Limami *et al.*, 2002). Le travail proposé dans ce chapitre s'inscrit dans la suite de cette étude et vise à mettre en évidence d'autres gènes du métabolisme azoté impliqués dans le contrôle de la vitesse de germination des lignées Io et F2. Pour cela, des gènes candidats ont été identifiés, ainsi que l'existence d'un polymorphisme au niveau de leur expression au cours de la germination des deux lignées parentales.

RESULTATS

1- Germination des lignées parentales Io et F2

La différence de vitesse de germination des lignées Io et F2 a déjà été caractérisée lors d'une étude antérieure. Sachant que chaque lot de grains possède ses propres caractéristiques (pourcentage de germination, vitesse, poids), il était important d'établir les courbes de germination pour les lots utilisés et ainsi déterminer leur T50, dans les nouvelles conditions.

Les grains des lignées Io et F2 ont été mis à germer sur 5 ml d'eau dans des boîtes de Petri à 20°C. Des courbes de germination et des courbes d'imbibition ont été réalisées pour ces deux lignées (fig. n°21). La courbe de germination correspond au pourcentage de grains germés au cours du temps. L'analyse de la figure n°21 révèle que la lignée Io germe plus vite que la lignée F2. Le T50, qui correspond au temps nécessaire pour la germination de 50% des grains, est de 52h pour la lignée Io et 74h pour la lignée F2.

Afin de s'assurer que la différence de vitesse de germination observée n'est pas due à une différence d'absorption d'eau, la prise d'eau a été mesurée au cours du temps. Les courbes d'imbibition (fig. n°21) montrent que pendant les deux premières phases de la germination au sens strict (Bewley, 1997), l'absorption d'eau est similaire chez les deux lignées. La prise en eau se différencie, chez les deux lignées, au moment de la troisième phase de la germination, qui correspond à la reprise de la croissance.

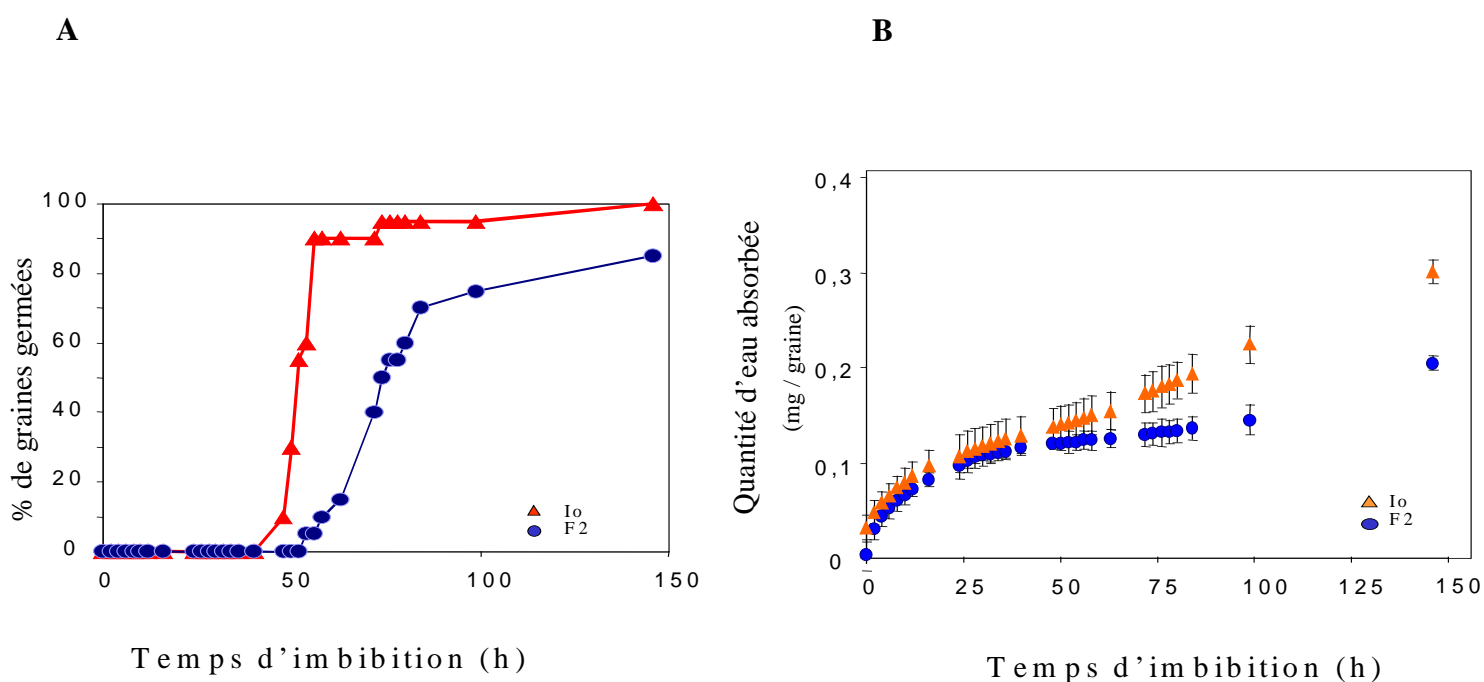


Figure 21 : Germination des lignées Io et F2. Les grains de maïs ont été mis à germer à 20°C dans des boîtes de Petri contenant 5 ml d'eau stérile. **A** Courbe de germination. Le pourcentage de grains germés a été relevé à des heures régulières. **B**. Courbe d'imbibition. Le poids frais des grains a été mesuré toutes les 3h dans les premières phases de la germination. La quantité d'eau absorbée présentée correspond au poids frais moins le poids sec des grains. Les écarts-types ont été calculés à partir de trois répétitions de lot de 30 grains.

2- Evolution de la teneur en acides aminés totaux au cours de la germination mesurée par la méthode de Rosen

L'évolution de la teneur en acides aminés a été évaluée dans le but de vérifier si la différence de germination entre la lignée Io et la lignée F2 est accompagnée d'une différence dans la teneur en acides aminés au cours de la germination, ceci dans l'optique de lier la vitesse de germination et le métabolisme de l'azote.

La méthode de Rosen (1957) permet, avec simplicité et rapidité, de doser par colorimétrie les acides aminés totaux. Elle est réalisée sur les embryons et les albumens des lignées Io et F2 au cours de la germination. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau n°IV. Les résultats montrent que les tissus de l'embryon sont plus riches en acides aminés que les tissus de l'albumen, ceci chez les deux lignées. En effet, dans l'albumen du grain sec, la teneur en acides aminés est de 20 $\mu\text{mol/mg}$ d'extrait frais et de 37 $\mu\text{mol/mg}$ d'extrait frais chez la lignée Io et chez la lignée F2 respectivement. La teneur en acides aminés est de 213 $\mu\text{mol/mg}$ d'extrait frais et de 528 $\mu\text{mol/mg}$ d'extrait frais dans l'embryon de Io et F2. En ce qui concerne l'évolution des acides aminés totaux chez la lignée Io et chez la lignée F2 au cours de la germination, aucune tendance particulière n'a été relevée.

Tableau IV : Teneur en acides aminés de l'embryon et de l'albumen des lignées Io et F2. La germination à été effectuée sur 5ml d'eau à 20°C. Après 0h, 24h, 52h, 74h et 96h d'imbibition, les embryons et les albumens sont séparés et réduits en poudre. Les acides aminés sont extraits de la poudre par la méthode d'extraction hydroalcoolique et dosés par la méthode de Rosen (1957).

Teneur en acides aminés ($\mu\text{mol/mg}$ d'extrait frais)	Embryon Io	Embryon F2	Albumen Io	Albumen F2
0h	528	213	37	20
24h	275	240	28	5
52h	406	309	41	22
74h	330	321	78	68
96h	403	539	86	140

3- Evolution de la teneur de chaque acide aminé au cours de la germination mesurée par HPLC

L'évolution de la teneur de chaque acide aminé a été dosée par HPLC. L'objectif est d'une part de connaître comment évolue la composition en acides aminés, qui reflète les processus d'inter-conversion au cours de la germination et d'autre part d'évaluer l'existence d'un polymorphisme de ces processus entre la lignée Io et la lignée F2, ceci toujours dans l'optique de lier la vitesse de germination et le métabolisme de l'azote.

L'HPLC est une chromatographie performante qui permet la séparation des composés d'un mélange complexe, tel que les échantillons biologiques. L'avantage de cette méthode, par rapport à la méthode de Rosen (1957), est de pouvoir doser chaque acide aminé de manière fiable. Grâce à cette technique, les acides aminés des embryons de maïs ont pu être séparés et dosés individuellement.

Les figures n°22 et n°23 montrent l'évolution de la proportion de chaque acide aminé dans l'embryon et l'albumen des deux lignées Io et F2 à 0h, 24h, 52h, 74h et 96h d'imbibition. Les résultats montrent que l'asparagine est de loin l'acide aminé le plus important dans le grain sec des deux lignées (57% chez Io et 47% chez F2). Dans le grain sec des deux lignées l'Asp, l'Asn et le Glu représentent environ 70% des acides aminés. Au cours de la germination, leur proportion diminue en faveur des acides aminés Ala, Ser, Gln et Val. Les différences entre Io et F2 en terme de distribution des acides aminés sont beaucoup plus marquées dans l'embryon que dans l'albumen. De plus, les acides aminés de la voie de l'aspartate ont tendance à s'accumuler dans l'embryon de F2. En effet, les pourcentages de lysine, méthionine et thréonine sont plus importants chez F2 (Lys 2,4%, Met 2,3% et Thr 3,2%) que chez Io (Lys 1,2%, Met 1,2% et Thr 2,5%).

En somme, les résultats montrent que, dans le grain sec, les acides aminés se répartissent sensiblement de la même façon chez Io et F2. Par contre, le métabolisme des acides aminés au cours de la germination est spécifique de chaque lignée ; en effet l'évolution de la proportion de chaque acide aminé se différencie au cours de l'imbibition.

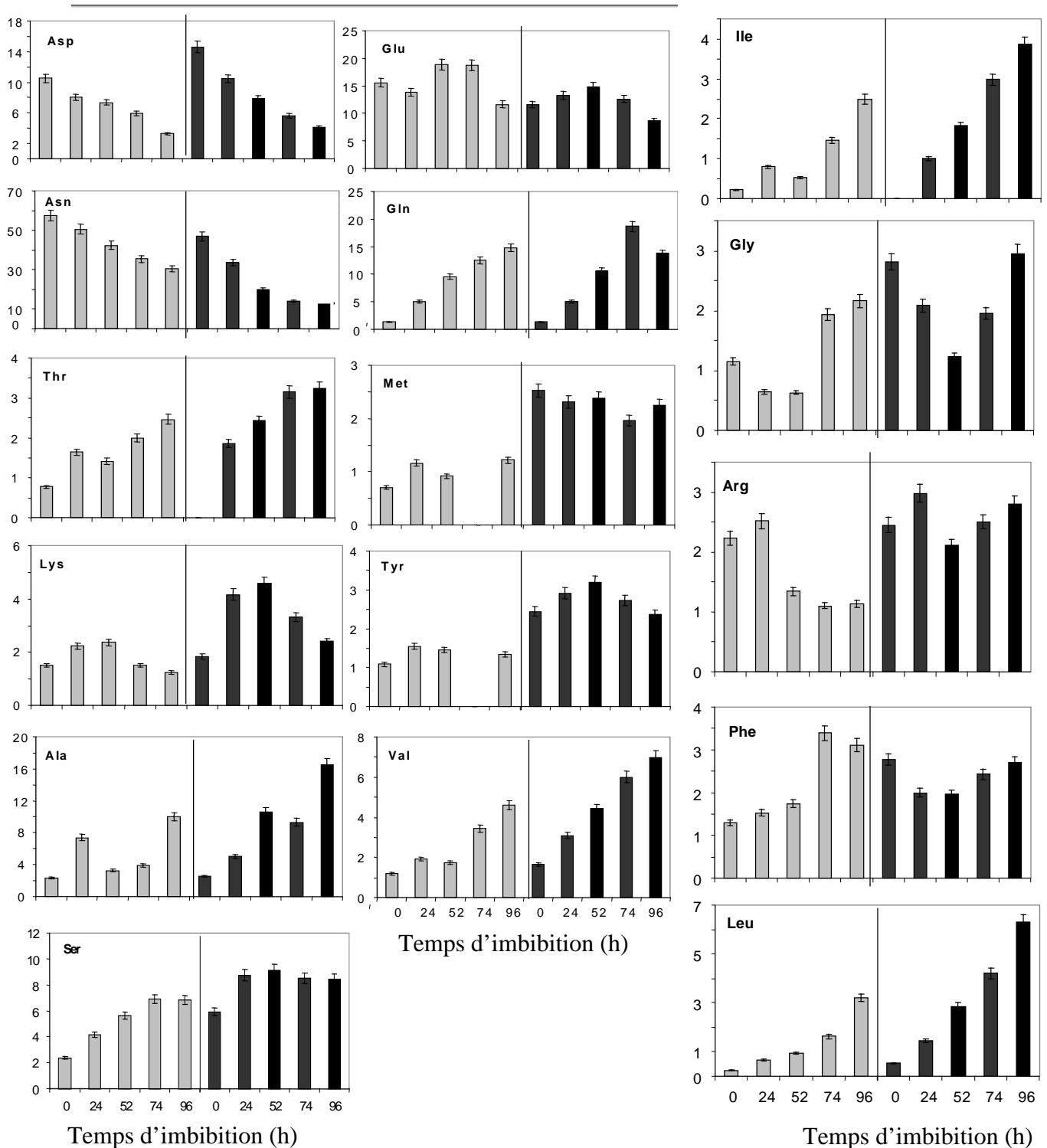


Figure 22 : Evolution de la teneur en acides aminés de l'embryon des lignées Io (histogramme gris) et F2 (histogramme noir). La germination a été effectuée sur 5 ml d'eau à 20°C. Après 0h, 24h, 52h, 74h et 96h d'imbibition, les embryons ont été prélevés et réduits en poudre. Les acides aminés sont extraits de la poudre par la méthode d'extraction hydroalcoolique puis séparés et dosés par chromatographie liquide haute performance. Les valeurs sont exprimées en pourcentage d'un acide aminé par rapport à l'ensemble des acides aminés détectés. Les écarts-types ont été calculés à partir de trois répétitions.

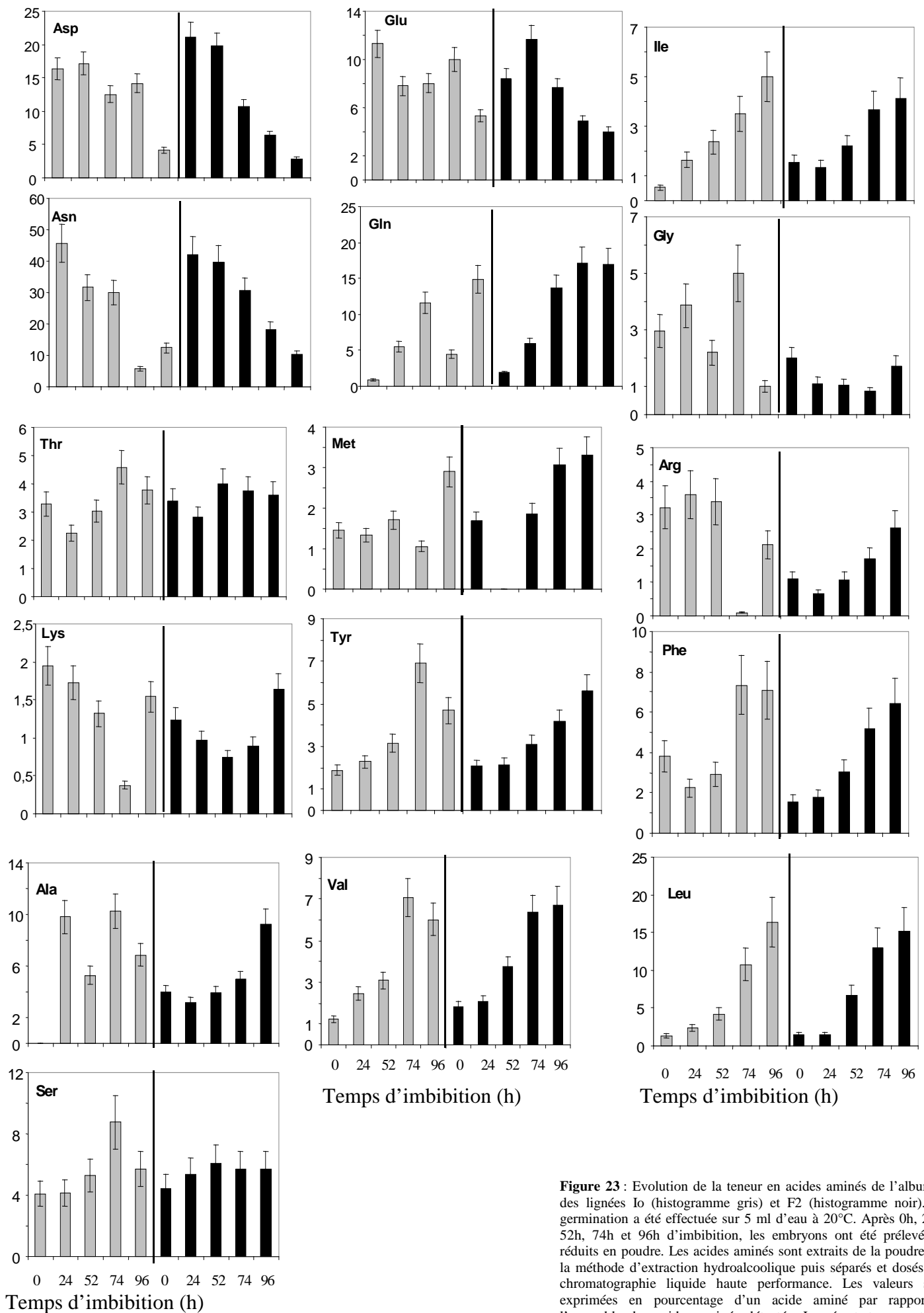


Figure 23 : Evolution de la teneur en acides aminés de l'albumen des lignées Io (histogramme gris) et F2 (histogramme noir). La germination a été effectuée sur 5 ml d'eau à 20°C. Après 0h, 24h, 52h, 74h et 96h d'imbibition, les embryons ont été prélevés et réduits en poudre. Les acides aminés sont extraits de la poudre par la méthode d'extraction hydroalcoolique puis séparés et dosés par chromatographie liquide haute performance. Les valeurs sont exprimées en pourcentage d'un acide aminé par rapport à l'ensemble des acides aminés détectés. Les écarts-types ont été calculés à partir de trois répétitions.

4- Gènes candidats

Les gènes qui co-localisent avec les QTLs de vitesse de germination ont été recherchés, dans le but de trouver le gène ou le cluster de gènes qui explique la différence de vitesse de germination entre les lignées Io et F2. Afin d'identifier les gènes localisés dans les zones de QTLs, la carte génétique issue des travaux de Limami *et al.* 2002 a été projetée sur d'autres cartes génétiques : IBM2 Neighbors, pioneer composite 1999 et Genetic 1997. Dans la zone des QTLs, environ 18 gènes ont été identifiés, grâce à la base de données <http://www.maizegdb.org> (fig. n°24). Certains codent pour des protéines pouvant être impliquées dans le contrôle de la vitesse de germination :

- l'alpha-amylase et l'isoamylase interviennent dans des processus d'hydrolyse de l'amidon, nécessaire à la dégradation des réserves.

- le facteur de transcription *knox 7* et le facteur de transcription *goliath* interviennent dans la régulation de la transcription.

- l'*ask2*, l'*akh1*, l'*akh2*, la glycéraldéhyde-3-phosphate-déshydrogénase, la glutamine synthétase 5, l'UDP glucose pyrophosphate, la ser/thr protéine phosphatase interviennent dans le métabolisme carboné ou azoté.

- la peroxydase, la catalase, la ferritine interviennent dans les processus de détoxification en cas de stress oxydatif.

Parmi l'ensemble des gènes qui co-localisent avec les QTLs, nous avons retenu les gènes codant pour l'*ask2*, l'*akh1* et l'*akh2*. Ils ont été retenus parce que ces gènes codent pour des aspartate kinases, enzymes clés de la synthèse des acides aminés essentiels (méthionine, thréonine, lysine, isoleucine) et parce qu'ils co-localisent avec 2 des 3 QTLs de vitesse de germination. Un gène candidat qui explique la présence d'un QTL doit présenter du polymorphisme de séquence, d'expression ou de régulation chez les lignées parentales.

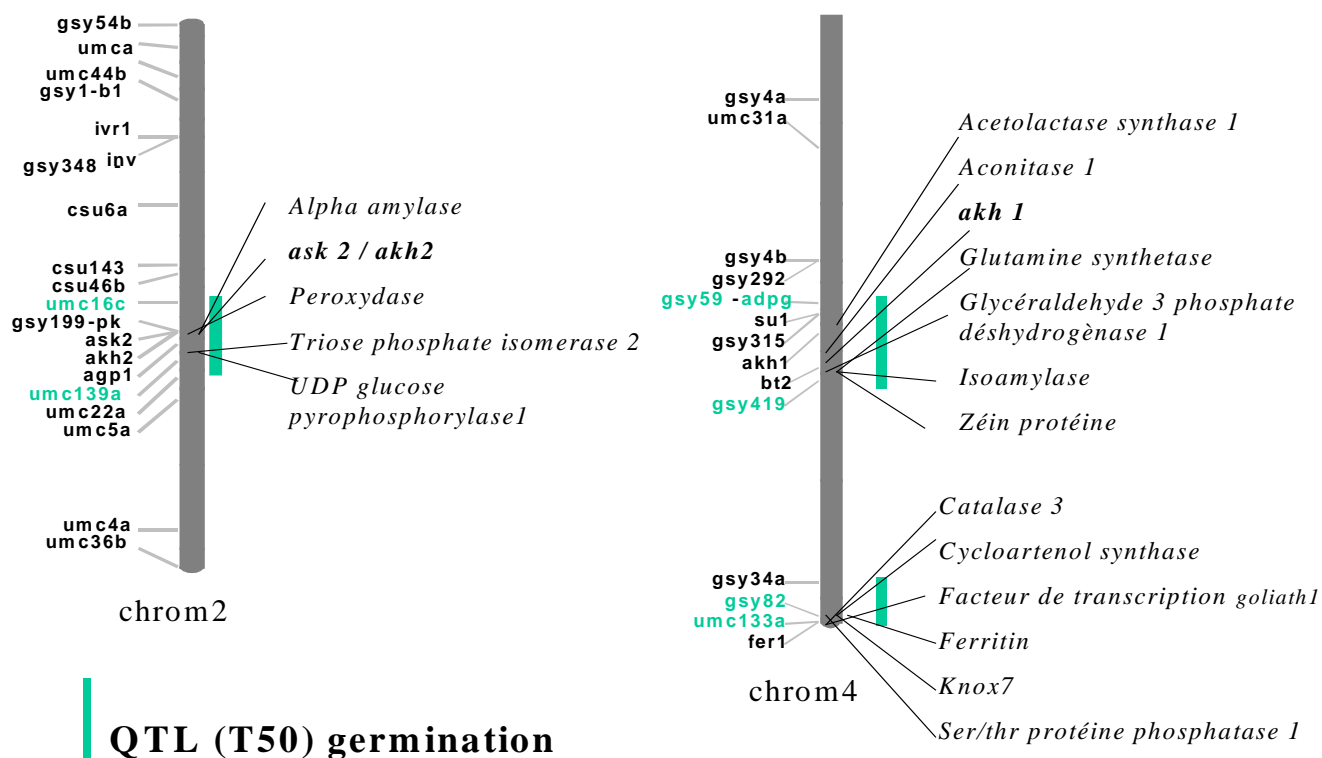


Figure 24 : Carte génétique partielle du maïs (chromosomes 2 et 4) et positionnement des trois QTLs de vitesse de germination (T50), d'après Limami *et al.* (2002). Les gènes identifiés dans les zones des QTLs, issus de la base de données <http://www.maizegdb.org>, sont reportés à droite des chromosomes.

5- Les différentes formes d'aspartate kinase chez le maïs

Avant d'étudier l'expression et la régulation des gènes candidats (*ask2*, *akh1* et *akh2*), il est nécessaire de rechercher les séquences de ces gènes et l'existence éventuelle de gène homologue. Les résultats de la recherche montrent qu'en plus des trois gènes candidats codant pour l'aspartate, il existe un autre gène l'*ask1* qui code également pour une aspartate kinase. Parmi les quatre gènes codant les aspartate kinases connues chez le maïs (*ask1*, *ask2*, *akh1* et *akh2*), seuls les gènes codant les aspartate kinases bi-fonctionnelles sont entièrement séquencés (annexe n°1). L'alignement des séquences nucléiques a mis en évidence des zones de très faible homologie indispensable pour la suite de l'étude. La partie de la séquence sélectionnée (fig. n°25) est positionnée au niveau de la zone 3'UTR. Dans les banques de données, les séquences d'aspartate kinase mono-

fonctionnelle chez le maïs sont sous forme de T.U.C. (tentative unique contig). Les séquences des T.U.C. de l'*ask1* et de l'*ask2* ont également été alignées (fig. n°26).

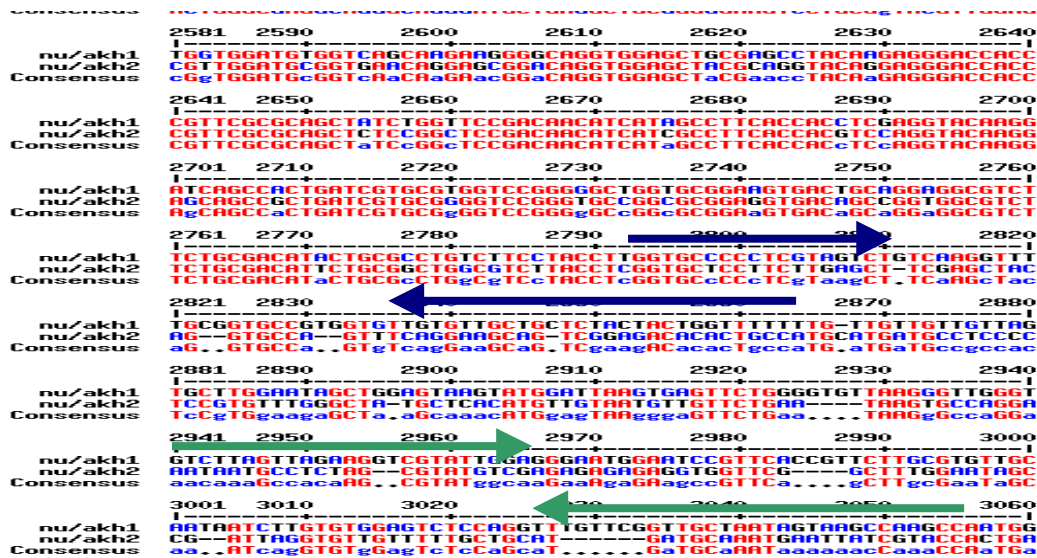


Figure 25 : Alignement des séquences partielles des deux isoformes d'aspartate kinase-homoserine déshydrogénase (*akh1* et *akh2*). La zone de fixation des amorces spécifiques est matérialisée par des flèches bleues pour *akh1* et vertes pour *akh2*.

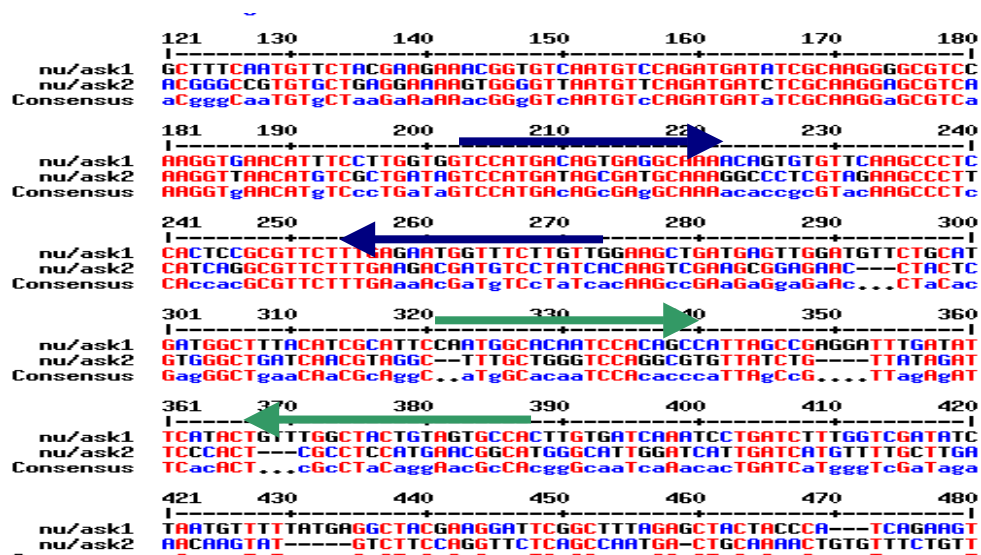


Figure 26 : Alignement des séquences partielles des deux isoformes d'aspartate kinase (*ask1* et *ask2*). La zone de fixation des amorces spécifiques est matérialisée par des flèches bleues pour *ask1* et vertes pour *ask2*.

6- Expression des gènes par qt-RT-PCR

L'expression des gènes est très souvent évaluée par l'intermédiaire des quantités relatives de transcrits. La qt-RT-PCR est une technique efficace qui permet de mettre en évidence de faibles différences de quantité d'ARNm d'un gène entre différents échantillons. Afin d'écartier la possibilité que les différences soient liées aux variations d'efficacité des manipulations à chaque étape (extraction des ARN, RT-PCR) pour chaque échantillon, il est nécessaire d'avoir un gène de référence dont l'expression ne varie pas ou peu au cours de la germination. Les gènes codant pour les ARNr 18S, reconnu pour avoir une expression relativement constante, est utilisé comme gène contrôle. La qt-RT-PCR est utilisée pour mettre en évidence l'expression des gènes candidats *ask2*, *akh1*, et *akh2*, du gène *ask1* et des gènes codant pour les ARNr 18S au cours de la germination. Afin de déterminer des amorces spécifiques de chaque gène nous avons comparé les domaines d'activité entre eux. Il en ressort que les AKs mono-fonctionnelles sont très différentes des AKs bi-fonctionnelles. Le pourcentage d'homologie est de 15% entre le domaine AK de l'AKH et les AK et moins de 20% entre le domaine homosérine déshydrogénase de l'AKH et l'HSDH. Ceci a donc rendu assez facile la détermination des amorces spécifiques.

L'expression des gènes codant les ARNr 18S est relativement constante au cours de la germination des deux lignées. Les variations observées entre deux points n'excèdent jamais un facteur de 1,2 pour la lignée Io et 1,5 pour la lignée F₂ (fig. n°27).

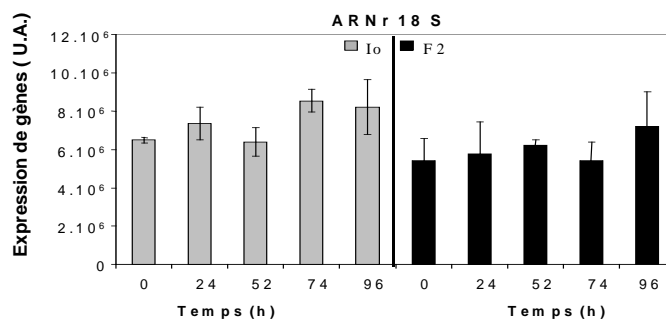


Figure 27 : Analyse par qt-RT-PCR de l'expression des gènes codant pour l'ARNr 18S. L'étude est faite au cours de la germination de la lignée Io (gris) et de la lignée F₂ (noir) sur des ADNc dilués 100X. Les écarts-types ont été calculés à partir de trois répétitions

Les quatre gènes d'AKs (*ask1*, *ask2*, *akh1* et *akh2*) sont exprimées dans l'embryon du maïs au cours de la germination, dès le stade graine sèche (t = 0). Quel que soit le gène, l'expression est plus importante chez Io que chez F₂. Le recouvrement des écarts-types de 4/5 échantillons de la lignée Io et de 5/5 de la lignée F₂ révèle un niveau constant de l'expression du gène *ask1* au cours de la germination et ce pour les deux lignées (fig. n°28). L'expression s'est avérée beaucoup plus forte, d'un facteur 3 environ, chez la lignée Io par rapport à la lignée F₂. Les résultats montrent que l'expression du gène *ask2* augmente au cours de la germination chez les deux lignées. Une différence d'un facteur 5 entre l'expression au point 24h et le point 52h a été observée. L'expression du gène *akh1* augmente légèrement dans les premières phases de la germination puis diminue à la fin de la germination. Cette tendance a été observée pour les deux lignées (fig. n°28). L'analyse de l'expression du gène *akh2* montre une forte augmentation de l'expression d'un facteur 5 au cours de la germination chez la lignée Io (fig. n°28). Cette augmentation est moins marquée chez la lignée F₂. Les niveaux d'expression des gènes *ask1*, *akh1* et *akh2* sont sensiblement du même ordre alors qu'il est bien plus important, d'un facteur 10, pour le gène *ask2* chez les deux lignées. La différence la plus marquée d'expression des différentes formes entre la lignée Io et la lignée F₂ a été mise en évidence pour l'expression du gène *akh2*. En effet, chez la lignée Io, à germination rapide, l'expression augmente d'un facteur 7 au cours de la germination (facteur 3 chez F₂) et le niveau d'expression est 3,5 fois plus important chez Io que chez la lignée F₂.

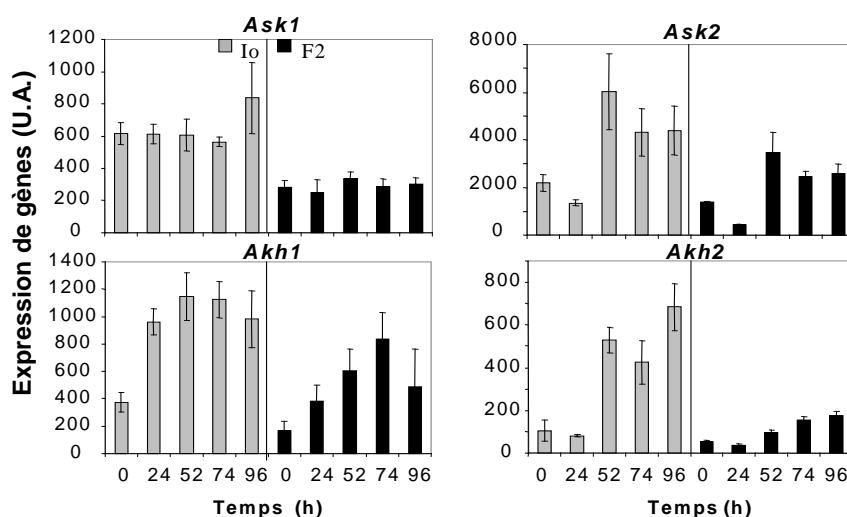


Figure 28 : Analyse par qt-RT-PCR de l'expression des gènes *ask1*, *ask2*, *akh1* et *akh2*. L'étude est faite au cours de la germination de la lignée Io (gris) et de la lignée F₂ (noir) sur des ADNc dilués 4X. Les écarts-types ont été calculés à partir de trois répétitions.

7- Etude de l'activité aspartate kinase

Le dosage de l'activité AK permettra, lorsqu'il sera effectué sur la population de RILs¹, de positionner l'activité enzymatique sur une carte génétique. Pour cela, il est nécessaire de mettre en évidence un polymorphisme d'activité entre les lignées parentales Io et F2. Il sera par la suite possible de comparer la position des QTLs de l'activité des AKs avec la position des QTLs de germination détectés par Limami *et al.* 2002 et conséquent d'établir une liaison entre l'activité enzymatique des AKs et la différence de vitesse de germination entre les lignées Io et F2.

L'extraction et le dosage d'activité des AKs ont été effectués selon (Dotson *et al.*, 1989). Les AKs ont été extraites des feuilles et des graines des deux lignées parentales Io et F2. Une activité de 75 nM L-Aspartic- β -hydroxamate formés / min a été détectée dans les feuilles, alors qu'aucune activité n'a été détectée dans les extraits de graines au cours de la germination. Il n'a pas été possible de connaître l'origine de l'absence de détection d'activité enzymatique AK dans les grains. L'extraction et la purification des AKs demandent une quantité de matière végétale très importante et le dosage de l'activité enzymatique est très peu fiable. Le protocole n'a donc pas pu être mis en place, étant donné la nécessité d'avoir des résultats fiables, reproductibles et réalisables sur un grand nombre d'échantillons. L'étude du polymorphisme de l'activité AK n'est pas possible par cette méthode. Toujours dans l'optique de mettre en évidence un polymorphisme au niveau de l'activité enzymatique de l'AK, une méthode alternative par suivi isotopique a été envisagée.

8- Etude *in vivo* de la voie de l'aspartate par GCMS-HRSIM chez les lignées Io et F2

Des processus biologiques très fins peuvent être mis en évidence grâce à la puissance et la précision de mesure offerte par la technique GC-MS. Dans cette étude,

l'isotope ^{15}N apporté par l'Asp- ^{15}N est utilisé afin de suivre le cheminement du groupement amine dans les différents métabolites.

Les résultats sont présentés en % AA- ^{15}N . Il représente le pourcentage de l'AA- ^{15}N par rapport à la quantité totale de cet acide aminé. Exemple : 10 % Met- ^{15}N signifie que 10 % de la méthionine est marqué par rapport au pool total de méthionine (Met- ^{14}N et Met- ^{15}N). Contrairement aux résultats présentés en mol%, cette valeur ne donne pas d'indication sur l'importance de l'acide aminé par rapport à l'ensemble des autres acides aminés. De ce fait, les résultats sont également exprimés en mol%, reflétant la réalité des flux de synthèse, qui correspond au nombre de moles de l'AA- ^{15}N ou de l'AA- ^{14}N par rapport à la quantité totale de tous les acides aminés. Les deux types de mesure sont nécessaires pour visualiser le cheminement du groupement et connaître l'importance des néo-synthèses. Lorsque le % d'un AA- ^{15}N augmente, il peut signifier soit une augmentation de la néo-synthèse de l'AA- ^{15}N et une stabilité de l'AA- ^{14}N préexistant, soit une stabilité de l'AA- ^{15}N et une diminution de l'AA- ^{14}N . Cette différence est très significative en terme de physiologie et métabolisme. Le premier cas montre une prédominance de la néo-synthèse à partir de l'aspartate, qui implique des activités enzymatiques différentes du deuxième cas, qui montre l'utilisation des réserves et la dégradation des protéines.

Les résultats obtenus montrent que l'Asp- ^{15}N est intégré dans le métabolisme (fig. n°29). Le pourcentage d'aspartate marqué augmente au cours du temps chez les deux lignées (8% à 40% chez Io et de 6% à 37% chez F2). Le profil de la thréonine est sensiblement identique à celui de l'Asp- ^{15}N : on observe une augmentation du pourcentage de Thr- ^{15}N chez les deux lignées (9% à 35% chez Io et 4% à 15% chez F2) bien que l'augmentation soit moins marquée chez F2. Le pourcentage de Met- ^{15}N diminue chez la lignée Io (19% à 1%) alors qu'elle est totalement absente chez la lignée F2. Le résultat inverse est observé pour la lysine. En effet, la lysine augmente au deuxième temps de marquage chez la lignée F2 (1% à 20%) et est totalement absente chez la lignée Io. Les résultats montrent également une augmentation de Gln- ^{15}N (11% à 37 % chez Io et 4% à 37% chez F2) et de Glu- ^{15}N (7% à 41% chez Io et 6% à 40% chez F2). Ainsi, le suivi isotopique des acides aminés- ^{15}N montre que l'Asp- ^{15}N est dégradé différemment en fonction des lignées. En effet, il est dégradé en méthionine et thréonine chez la lignée Io alors qu'il est dégradé en lysine et thréonine chez la lignée F2.

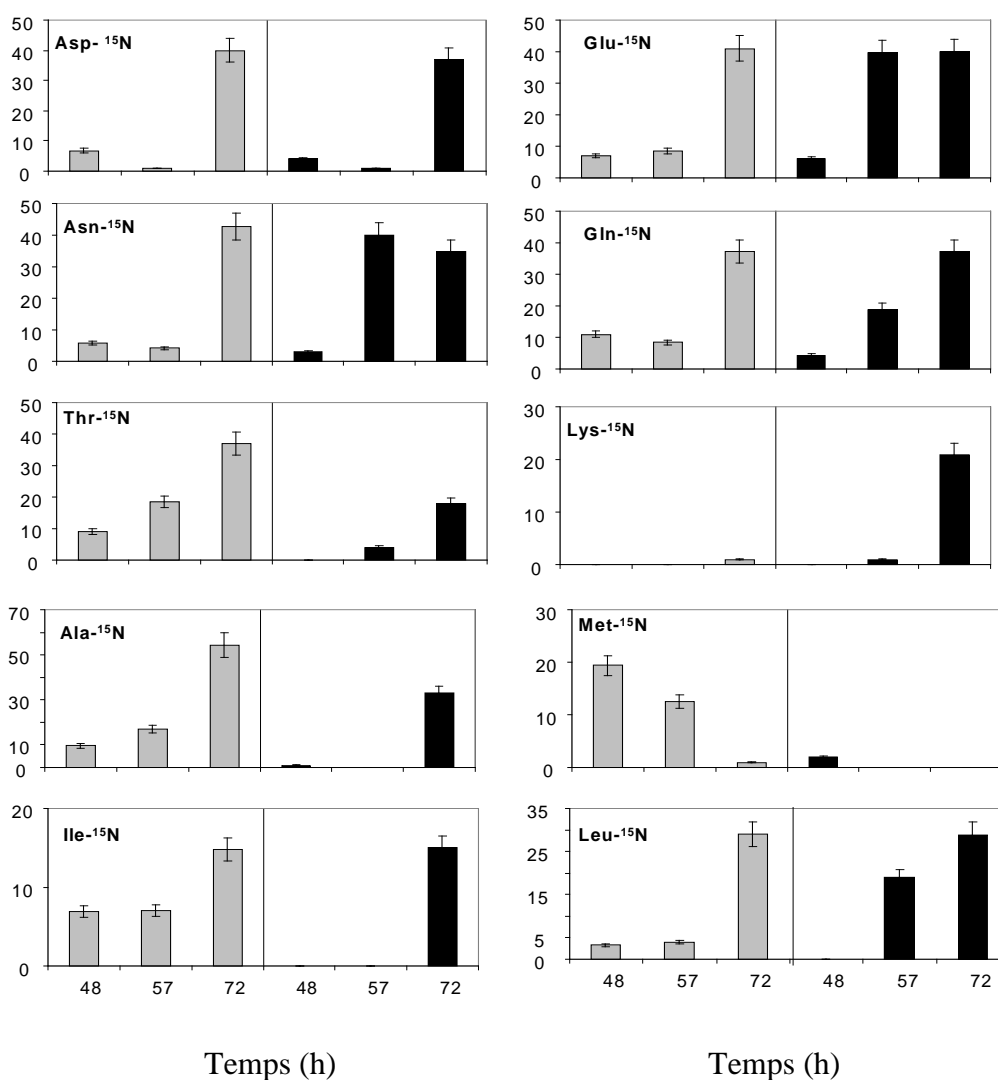


Figure 29 : Pourcentage de l'isotope ^{15}N dans les acides aminés. Les graines ont été imbibées 24h avec de l'eau stérile puis ont été transférées sur un milieu contenant de l'Asp- ^{15}N pendant 24h, 33h et 48h. Les temps 48h, 57h, 72h, sur la figure indiquent la période totale d'imbibition. Les embryons ont été prélevés et réduits en poudre. Les acides aminés sont extraits de la poudre par la méthode d'extraction hydroalcoolique puis séparés et dosés par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse. La valeur représente la quantité d'acides aminés marqués au ^{15}N par rapport au pool total de cet acide aminé. Les écarts-types ont été calculés à partir de trois répétitions.

L'analyse de l'évolution des acides aminés ^{14}N en mol% permet de mettre en évidence les flux d'acides aminés libres stockés ou provenant de l'hydrolyse des protéines. Les résultats obtenus montrent que l'asp- ^{14}N diminue au cours du temps (32 mol% à 19 mol% chez Io et 19 mol% à 7 mol% chez F2) (fig n°30). Le profil du pourcentage de Met- ^{14}N , de Thr- ^{14}N de Lys- ^{14}N est sensiblement identique chez les deux lignées au cours de la germination. Le pourcentage de la Met- ^{14}N et de la Thr- ^{14}N est relativement stable au

cours des trois mesures, par contre une diminution notable du pourcentage de la lysine au moment de la troisième mesure est observée. En ce qui concerne la Glu-¹⁴N et la Gln-¹⁴N, les résultats obtenus montrent qu'inversement au pourcentage de Glu-¹⁴N, le pourcentage de Gln-¹⁴N est plus important chez F2 que chez la lignée Io.

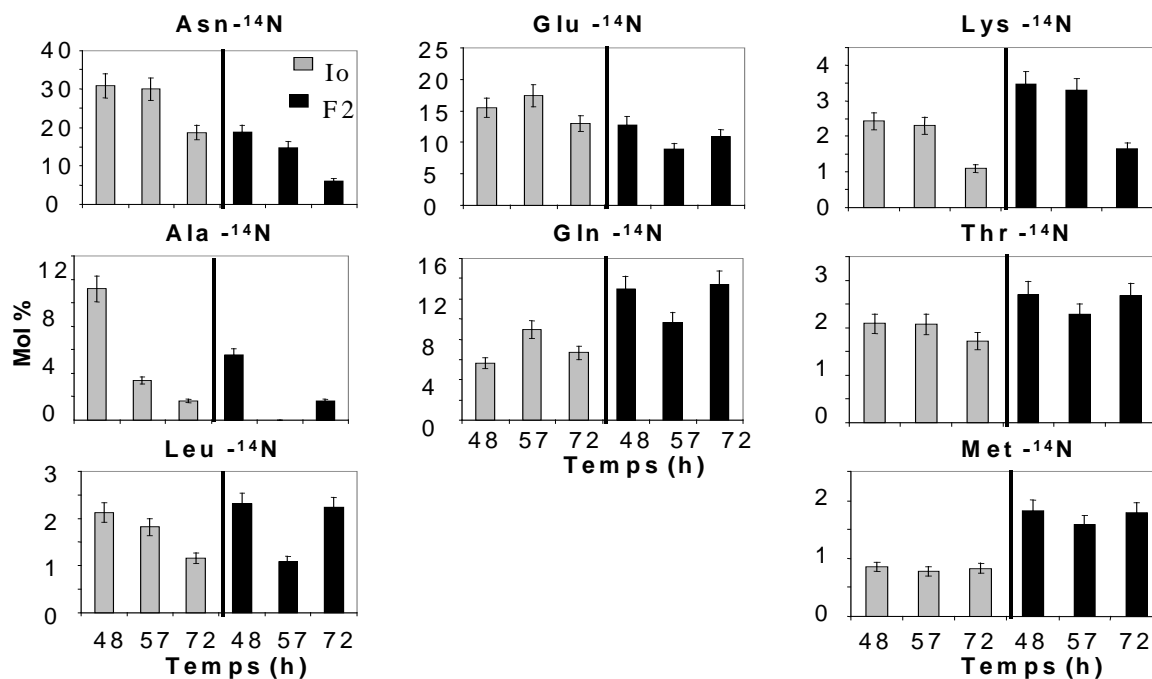


Figure 30 : Variation des acides aminés ¹⁵N et des acides aminés- ¹⁴N dans l'embryon des lignées Io et F2 du maïs. Les graines ont été imbibées 24h avec de l'eau stérile, puis ont été transférées sur un milieu contenant de l'Asp-¹⁵N pendant 24h, 33h et 48h. Les temps 48h, 57h, 72h, sur la figure indiquent la période totale d'imbibition. Les dosages ont été effectués par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse. **A.** : Les acides aminés ¹⁵N correspondent aux acides aminés néo-synthétisés à partir de l'Asp-¹⁵N fourni. **B.** : Les acides aminés proviennent de la dégradation des protéines et des acides aminés libres. Les écarts-types ont été calculés à partir de trois répétitions.

9- Germination sur acides aminés de la voie de l'aspartate

Les lignées Io et F2 montrent un polymorphisme dans le métabolisme des acides aminés, en particulier ceux de la voie de l'aspartate. En supposant que la vitesse de germination soit liée à la teneur et à l'évolution de ces différents acides aminés endogènes, quelle serait l'influence de ces acides aminés en apport extérieur sur la vitesse de germination ? Dans le but de répondre à cette question, les graines des deux lignées ont été mises à germer sur la lysine, la méthionine et la thréonine à 5 mM dans des boîtes de Petri à 20°C. Les courbes de germination dans chaque condition ont été réalisées pour les deux lignées de maïs Io et F2 (fig. n°31) et une photographie montre l'évolution de la croissance post-germinative après 72h et 96h d'imbibition (fig. n°32 et 33). L'analyse de la figure n°31 révèle que la lignée Io germe plus vite que la lignée F2 dans les quatre conditions de germination sur acides aminés. La germination sur méthionine n'est pas très différente de la germination sur eau alors que la germination sur lysine est ralentie et la germination sur thréonine est accélérée chez la lignée Io. Les effets, de la lysine et de la thréonine sur la germination sont également observés sur la lignée F2, mais ils sont moins marqués que chez la lignée Io.

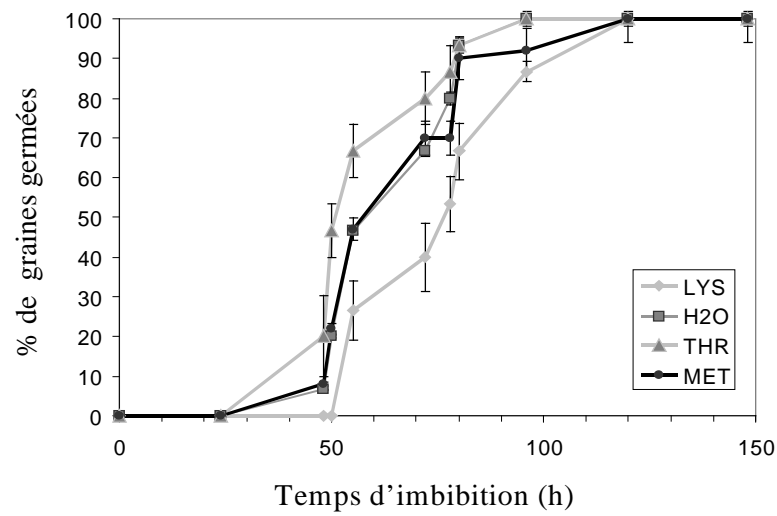
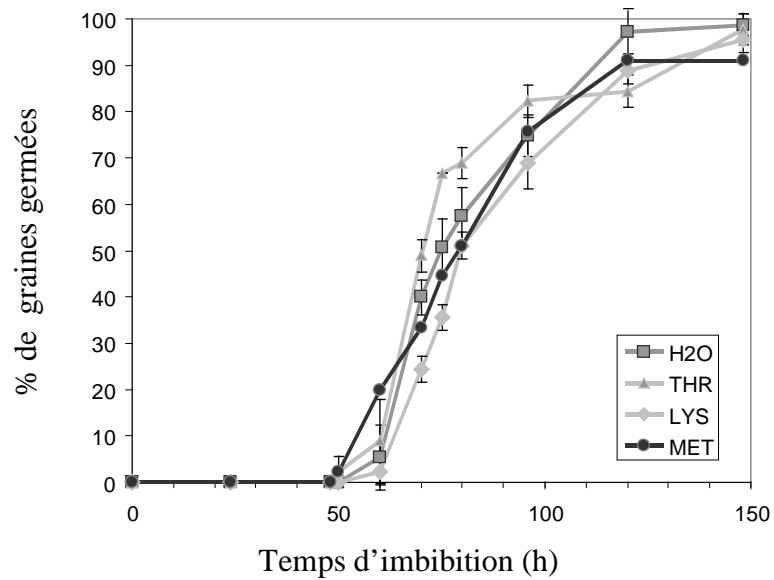
A**B**

Figure 31 : Courbe de germination de la lignée Io (A) et de la lignée F2 (B) en présence d'acides aminés. La germination a été effectuée avec 5ml d'eau, de lysine, de thréonine ou de méthionine à 5mM. Les écarts-types ont été calculés à partir de trois répétitions.

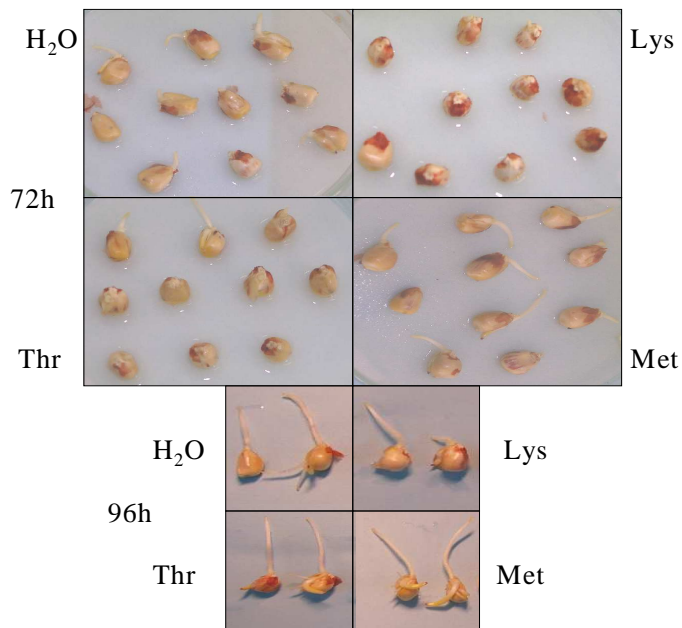


Figure 32 : Germination des grains de la lignée Io en présence d'acides aminés. La germination s'est déroulée en présence de 5ml d'eau, de lysine, de thréonine, de méthionine à 5 mM. Photographies prises après 72h et 96h d'imbibition.

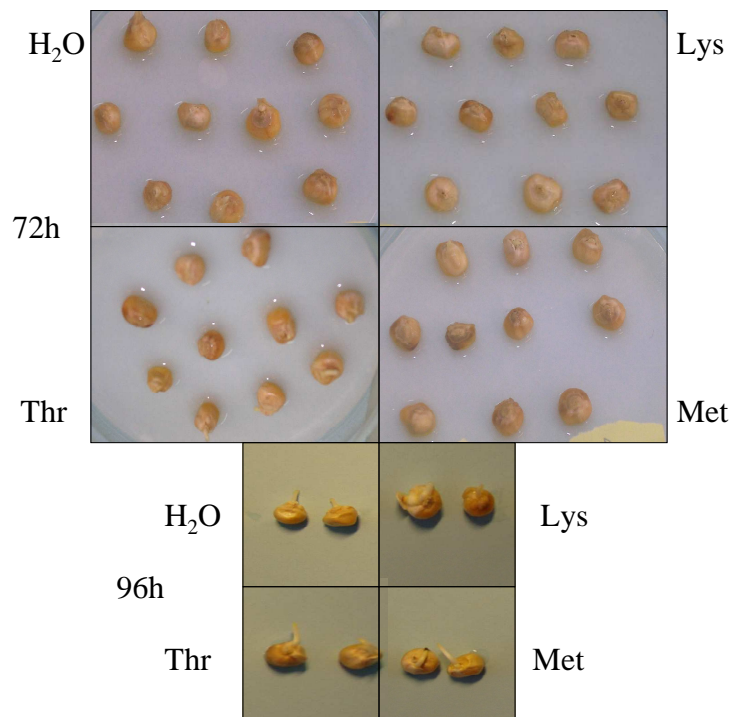


Figure 33 : Germination des grains de la lignée F2 en présence d'acides aminés. La germination s'est déroulée en présence de 5ml d'eau, de lysine, de thréonine, de méthionine à 5 mM. Photographies prises après 72h et 96h d'imbibition.

DISCUSSION

La nature des mécanismes impliqués dans la régulation fine du métabolisme lors de la maturation et la germination d'une graine n'est pas encore bien claire. Cette étude s'est intéressée à la compréhension des mécanismes impliqués dans le contrôle de la vitesse de germination en se basant sur une étude précédente de génétique quantitative. Les gènes codant pour l'aspartate kinase (*ask2*) et les aspartate kinase-homosérine déshydrogénases (*akh1* et *akh2*), enzymes clés de la voie de l'aspartate, co-localisent avec des QTLs de la vitesse de germination chez deux lignées Io et F2 de maïs. Afin de mettre en évidence l'implication de la voie de l'aspartate dans la vitesse de germination, nous nous sommes attachés à caractériser la germination dans différentes conditions, à suivre la teneur en acides aminés, à suivre l'expression de ces gènes au cours de la germination par une technique très sensible de RT-PCR quantitative en temps réel et à caractériser la voie de l'aspartate par un suivi isotopique au cours de la germination des deux lignées parentales Io et F2.

Les travaux de Limami *et al.* 2002 montrent une différence de vitesse de germination entre les deux lignées Io et F2 de maïs à 25°C et à 21°C. L'observation des courbes de germination montre une différence plus marquée à 21°C, ce qui signifie qu'en diminuant la température les écarts entre génotypes s'accroissent. Le choix de mener les expériences à 20°C s'est donc basé sur cette observation, afin d'évaluer le polymorphisme physiologique des lignées parentales dans des conditions qui les différencient le plus. La germination ainsi que la prise en eau ont été suivies au cours du temps. La similitude entre les courbes d'imbibition laisse supposer que la différence de germination possède une base génétique et ne repose pas sur une simple absorption d'eau à travers les téguments.

La composition en acides aminés a été évaluée par deux techniques. La première est la méthode de Rosen, qui permet le dosage des acides aminés totaux ; la deuxième est un dosage après séparation par HPLC, qui permet de doser les acides aminés individuellement de manière très fiable. L'analyse de la composition en acides aminés révèle que la lignée Io est plus riche en acides aminés que la lignée F2, ceci dans les tissus de l'embryon et de l'albumen. Les résultats ont montré que l'asparagine est de loin l'acide aminé le plus

important dans le grain sec du maïs (fig. n°34), comme c'est le cas chez *Medicago truncatula* (Glevarec *et al.*, 2004; Ricoult *et al.*, 2006) et *Arabidopsis thaliana* (Bewley et Black, 1994) mais également dans les feuilles et la sève chez le pêcher (Morot-Gaudry, 1997).

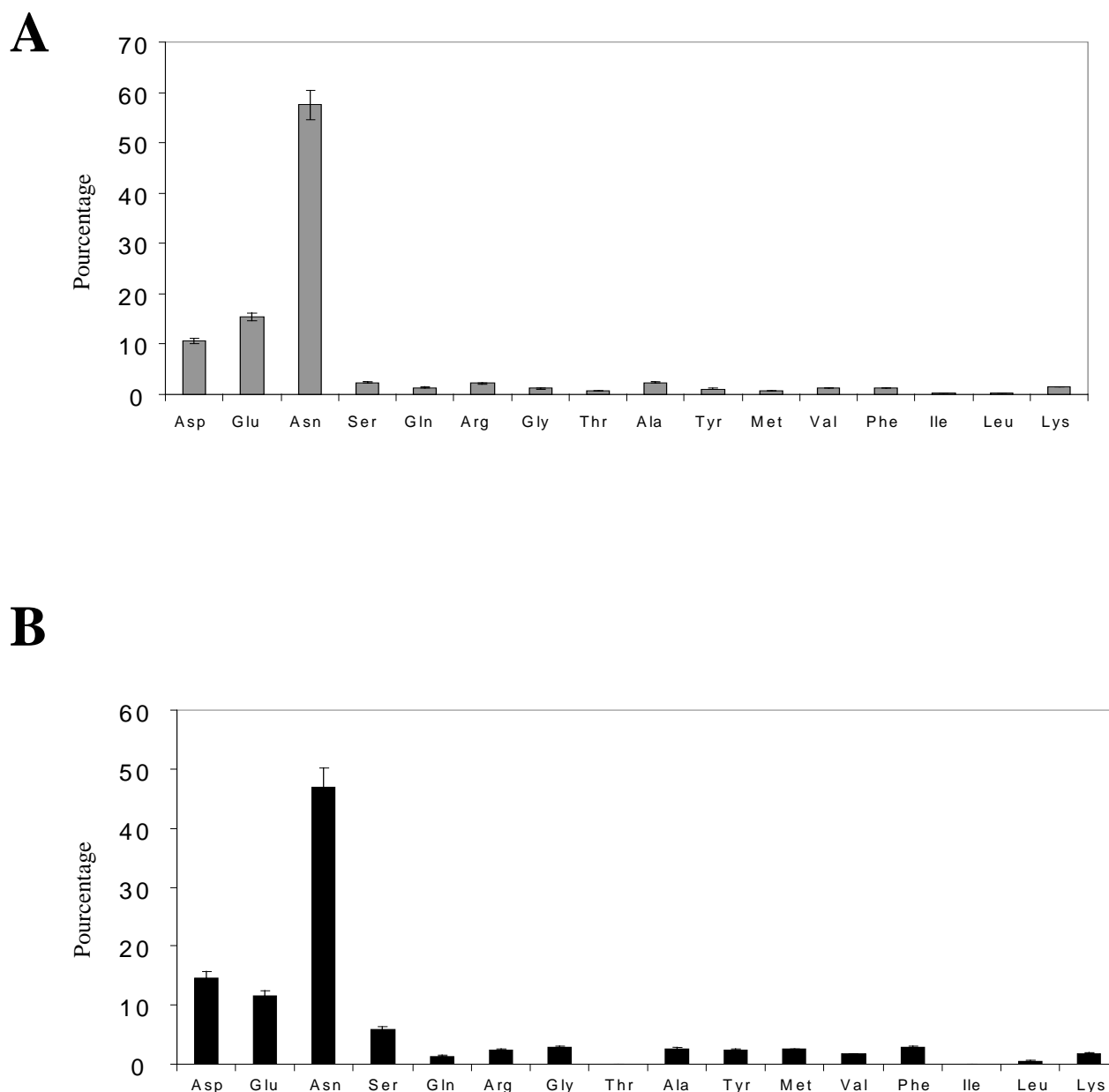


Figure 34 : Proportion de chaque acide aminé dans l'embryon de la graine sèche provenant de la lignée Io (**A**) et de la lignée F2 (**B**). Les embryons ont été prélevés et réduits en poudre. Les acides aminés sont extraits de la poudre par la méthode d'extraction hydroalcoolique puis séparés et dosés par chromatographie liquide haute performance. Les valeurs représentent le pourcentage d'un acide aminé par rapport à l'ensemble des acides aminés détectés. Les écarts-types ont été calculés à partir de trois répétitions.

Dans la graine, l'essentielle de l'azote est sous forme d'asparagine qui assure un rôle de stockage de l'azote (Bewley et Black, 1994). Une fois l'imbibition commencée, on observe une diminution de l'asparagine en faveur des autres acides aminés, ce qui signifie un transport et une mobilisation de l'azote au cours de la germination. Les résultats ont mis en évidence que le métabolisme des acides aminés au cours de la germination est différent pour chacune des lignées. En effet, dans le grain sec, les acides aminés se répartissent sensiblement de la même façon, mais l'évolution de la proportion de chaque acide aminé est différente entre les lignées. Par exemple, les acides aminés de la voie de l'aspartate ont tendance à s'accumuler dans l'embryon de F2. En effet, les pourcentages de lysine, méthionine et thréonine sont plus importants chez F2 (Lys 2,4%, Met 2,3% et Thr 3,2%) que chez Io (Lys 1,2%, Met 1,2% et Thr 2,5%) après 96h d'imbibition. L'évolution des acides aminés dans la lignée Io et F2 suggère une différence dans le turn-over des acides aminés au cours de la germination.

L'expression des gènes codant les aspartate kinases a été analysée par qt-RT-PCR au cours de la germination du maïs. Les quatre gènes d'aspartate kinases (*ask1*, *ask2*, *akh1* et *akh2*) sont exprimés dans l'embryon de maïs au cours de la germination. L'expression du gène codant l'*ask1* chez les deux lignées est relativement constante alors que l'expression des gènes *ask2*, *akh1* et *akh2*, qui co-localisent avec les QTLs, augmente au cours du temps. Ceci signifie que l'expression des gènes *ask2*, *akh1* et *akh2* est induite après l'imbibition du fait de l'activation de la voie de l'aspartate, alors que le gène *ask1* doit assurer le métabolisme de base chez les deux lignées Io et F2. L'expression relative du gène codant l'*ask2* est dix fois supérieure à celle des autres gènes. Les études de (Wang et Larkins, 2001; Wang *et al.*, 2001) ont montré que le gène *ask2* est responsable des différences en acides aminés libres dans le grain de maïs de divers génotypes. Les résultats de l'expression de l'*ask2* sont en accord avec ceux obtenus par la méthode de Rosen (1957) et par l'HPLC. En effet, la lignée Io présente un haut niveau d'expression de l'*ask2* et une teneur en acides aminés plus importante que la lignée F2. La comparaison du niveau d'expression des gènes entre les deux génotypes montre que l'expression des quatre gènes est toujours plus importante dans la lignée Io que dans la lignée F2. Cette différence indique que les allèles provenant de la lignée Io confèrent un haut niveau d'expression en particulier pour le gène *akh2* qui montre la plus forte différence entre les deux génotypes. Ceci semble conforter l'hypothèse que les gènes codant les aspartate kinases, localisé dans

la zone de QTL, seraient à l'origine d'un polymorphisme du métabolisme de l'aspartate, expliquant les différences de germination entre les lignées.

Il est intéressant de noter que le QTL de vitesse de germination sur le chromosome 2L co-localise avec *ask2* et *akh2*, les deux gènes qui se différencient le plus. Le premier, l'*ask2*, est impliqué dans le remplissage du grain en acides aminés libres (Wang et Larkins, 2001; Wang *et al.*, 2001), ce qui expliquerait la différence au niveau de la teneur totale en acides aminés entre les deux lignées. Le deuxième, l'*akh2*, court-circuite la synthèse de lysine en faveur de l'accumulation de méthionine / thréonine (Muehlbauer *et al.*, 1994), ce qui expliquerait la différence au niveau de l'évolution et des proportions des acides aminés chez les deux lignées. Des études ont montré que l'expression des différents gènes de cette famille multigénique pouvait être modulée en fonction des besoins de la cellule, de l'organisme ou encore des conditions environnementales. En effet, chez *Arabidopsis thaliana*, l'*akh* est régulée par la lumière et par le saccharose (Zhu-Shimoni *et al.*, 1997) et subit un contrôle spatial et temporel au sein des tissus végétaux, graines et fleurs (Azevedo et Lea, 2001; Zhu-Shimoni et Galili, 1998). La différence en terme d'expression de l'*akh2* et en terme de teneur en acides aminés suggère une différence au niveau des besoins et du métabolisme entre les lignées au cours de la germination. Ceci est probablement directement ou indirectement lié à la vitesse de germination.

L'activité d'une enzyme est régie par l'ensemble des éléments de son environnement cellulaire, pH, tampon, température, co-facteur, inhibiteur, allostérie. De nombreuses études portant sur l'activité enzymatique sont réalisées *in vitro*. En générale, l'activité de l'enzyme est étudiée en dosant l'apparition ou la disparition d'un des produits de la réaction qu'elle catalyse. *In vitro*, il est très difficile de reproduire l'environnement cellulaire, ce qui limite l'interprétation entre les résultats obtenus et la réalité métabolique *in vivo*. Il est possible de s'affranchir de ce problème, entre capacité enzymatique *in vitro* et activité réelle *in vivo*, en passant par une technique de traçage isotopique. Dans la problématique abordée ici, doser les produits de la réaction n'aurait pas permis de conclure sur la différence de métabolisme entre ces deux lignées de maïs. En effet, les acides aminés peuvent provenir d'une synthèse issue de l'aspartate, mais aussi des réserves ou de la dégradation des protéines. Le suivi isotopique permet de différencier les acides aminés nouvellement synthétisés à partir de l'aspartate fourni marqué au ¹⁵N, des acides aminés existant dans la semence avant la reprise du métabolisme ou dérivant de la dégradation des

protéines de réserves. La caractérisation de la voie de l'aspartate par suivi isotopique montre que la lignée Io présente une prédominance du flux d'aspartate dans les branches méthionine et thréonine et que la lignée F2 présente une prédominance du flux d'aspartate dans la branche lysine. L'aspartate est aussi dirigé vers la synthèse de glutamine, acide aminé de stockage et de transport, de manière plus importante chez la lignée F2 que chez la lignée Io.

Il est intéressant de noter que le profil de la Thr-¹⁵N est en opposition à celui de la Met-¹⁵N. En effet, une diminution de méthionine est observée en parallèle d'une augmentation de la thréonine chez la lignée Io. Le flux de l'aspartate est plus important dans la branche de la méthionine dans un premier temps, puis le flux augmente dans la branche de la thréonine dans un deuxième temps. Ceci peut s'expliquer par la compétition entre la cystathionine- γ -synthase et la thréonine synthase pour homoserine-4-phosphate, précurseur commun de la synthèse des deux acides aminés qui est au départ en faveur de la synthèse de méthionine (Azevedo *et al.*, 2006). L'augmentation de la méthionine inhibe sa propre synthèse en inhibant la cystathionine- γ -synthase et stimule la synthèse de thréonine par l'intermédiaire de la S-adénosyl-méthionine (SAM) qui active la thréonine synthase (fig. n°35) (Azevedo *et al.*, 2006; Zeh *et al.*, 2001).

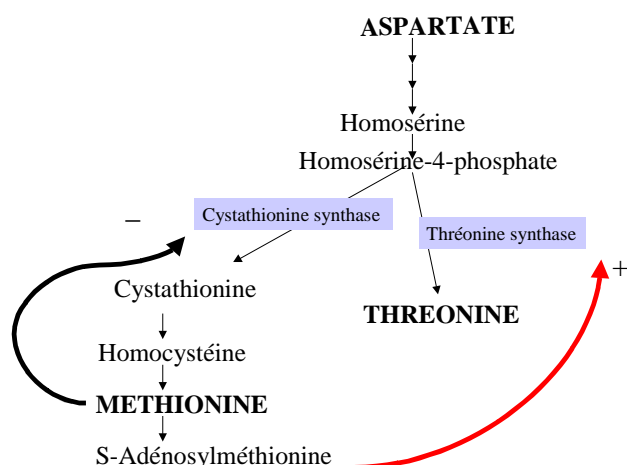


Figure 35 : Schéma simplifié de la biosynthèse de la méthionine et de la thréonine. Les flèches épaisses illustrent les phénomènes de rétro-stimulation (+) et de rétro-inhibition (-) que subissent la thréonine synthase et la cystathionine synthase.

L'étude de la voie de l'aspartate a montré des différences entre les lignées Io et F2 au niveau moléculaire et physiologique. La teneur en acides aminés, qui présente la balance entre la synthèse et le catabolisme ainsi que la quantité d'AA-¹⁵N formée, qui reflète la dynamique d'utilisation de l'aspartate, suggèrent que la lignée à vitesse rapide Io est accompagnée de haut niveau de synthèse et de catabolisme de la méthionine/ thréonine contrairement à la lignée F2 à vitesse lente. L'accumulation de lysine observée uniquement dans la lignée F2 conforte l'idée que le flux d'aspartate dans l'une des trois branches, méthionine/thréonine/lysine, serait en partie à l'origine des différences de vitesse de germination observées entre la lignée Io et la lignée F2. Deux raisons peuvent expliquer la liaison entre la vitesse de germination et le métabolisme de la voie de l'aspartate. La première est que la méthionine et la thréonine ont un rôle métabolique. En effet, en plus d'être des composés entrant dans la synthèse des protéines, ce sont aussi des précurseurs de métabolites clés impliqués dans la croissance comme la SAM, l'éthylène et les polyamines. La SAM est un donneur de méthyle nécessaire dans la synthèse de composés comme l'ADN, les protéines et les lipides et donneur de squelette carboné nécessaire à la synthèse de l'éthylène et des polyamines (Bartlem *et al.*, 2000; Galili, 1995). Le faible métabolisme de la méthionine et de la thréonine chez F2 serait limitant et pourrait expliquer le retard de développement observé lors de la germination de cette lignée à vitesse de germination lente. La deuxième raison est que l'accumulation de la lysine a un effet négatif sur la physiologie et le développement de la plante. Des études de transgénèse chez *Arabidopsis thaliana*, portant sur l'augmentation de la teneur en lysine par surexpression de la DHDPS et une inhibition du catabolisme par LKR-RNAi, ont montré que l'accumulation de lysine a un effet négatif sur la physiologie et la croissance de la plantule (Cattoir – Reynaerts *et al.*, 1981; Vauterin et Jacobs, 1994; Zhu et Galili, 2004). De plus, malgré un important intérêt porté sur l'enrichissement des céréales en lysine, peu d'expériences ont abouti. En effet la régulation fine de la teneur en lysine joue un rôle dans le développement et la croissance de nombreuses espèces ; de ce fait la teneur en lysine est toujours maintenue à un niveau donné (Ben-Tzvi Tzchori *et al.*, 1996).

L'influence d'un apport extérieur en acides aminés de la voie de l'aspartate sur la vitesse de germination a été testée par des courbes de germination des lignées Io et F2 en présence de méthionine, de thréonine et de lysine. Il en ressort que les acides aminés ont un

effet différent en fonction des lignées. Io est sensible à la thréonine et à la lysine. La thréonine stimule légèrement la germination par rapport à la germination en condition contrôle, contrairement à la lysine qui ralentit la germination. La germination de la lignée F2 est moins sensible à l'apport extérieur en acides aminés. En effet, les différences sont peu marquées entre la germination dans les différentes conditions. L'effet inhibiteur de l'apport extérieur de lysine sur la germination confirme un rôle physiologique négatif de l'excès de lysine sur le développement et la croissance. Cet effet négatif de la lysine a déjà été rapporté par différentes études sur *Arabidopsis thaliana* (Zhu et Galili, 2004). Il est important de noter que l'effet des acides aminés sur la vitesse de germination est dépendant du génotype. De plus la lignée F2, qui présente un fort taux de lysine et accumule le plus les acides aminés de la voie de l'aspartate, présente également une sensibilité moins importante à l'apport extérieur de ces acides aminés.

CONCLUSION

Durant les phases tardives de la germination et la croissance post-germinative qui précèdent l'acquisition de l'autotrophie, la source principale d'azote est la protéolyse qui génère de l'ammonium et des acides aminés. Les acides aminés subissent de nombreuses réactions d'inter-conversion qui génèrent un spectre assez large d'acides aminés pour satisfaire les besoins de la néo-synthèse protéique et le transport de l'azote. A travers de nombreuses études, l'équipe « métabolisme azoté et régulation » de l'UMR PMS tente de mieux cerner le métabolisme des acides aminés au cours de la germination de *Medicago truncatula* (Glevarec *et al.*, 2004; Ricoult *et al.*, 2006) et du maïs (Limami *et al.*, 2002). Ceci a pour but de mieux comprendre l'implication du métabolisme des acides aminés dans les processus de mobilisation, de transport et d'inter-conversion au cours des premières phases de développement. Les travaux sur le maïs ont mis en évidence des zones du génome impliquées dans le contrôle du caractère vitesse de germination chez deux lignées de maïs. L'investigation menée au niveau de ces zones a révélé que les gènes codant pour l'aspartate kinase sont de bons candidats pouvant, par leur polymorphisme, expliquer la présence des QTLs. L'étude de leur expression a été effectuée sur les lignées parentales qui ont servi à la production des RILs et donc à la détection des QTLs. Etudier

l'expression des gènes candidats, c'est étudier non seulement l'expression des ARN messagers mais également les protéines et leur activité enzymatique. En effet, la régulation de l'expression d'un gène peut se faire à différents niveaux : au niveau de la transcription, au niveau de la traduction et au niveau post-traductionnel. C'est pour cela que la détection du polymorphisme dû à ces gènes candidats a été effectuée au niveau des ARNm (expression de gènes par RT-PCR quantitative en temps réel), mais aussi au niveau des produits issus de l'activité enzymatique (dosage des acides aminés par HPLC) et au niveau de l'activité *in vivo* de l'enzyme (étude de la dégradation de l'aspartate par suivi isotopique en GC-MS).

L'analyse de l'expression des gènes a mis en évidence deux différences importantes entre les lignées Io et F2. La première est que l'expression des quatre gènes codant pour les aspartate kinases est toujours plus importante chez la lignée Io, à germination rapide, que chez la lignée F2, à germination lente. La deuxième est que le gène qui différencie le plus entre Io et F2 est l'*akh2*. L'activité de l'enzyme AKH2 est responsable d'un déséquilibre entre la synthèse de lysine/thréonine/méthionine (Muehlbauer *et al.*, 1994). C'est sans doute ce déséquilibre qui explique à la fois le polymorphisme de la teneur en acides aminés entre les lignées et la présence du QTL vitesse de germination au niveau du gène *akh2* sur le chromosome 2.

L'ensemble des observations, sur l'évolution de la teneur en acides aminés, l'expression des gènes et le suivi isotopique de la voie de l'aspartate au cours de la germination et la germination en présence d'acides aminés, montre qu'il existe un lien entre le flux d'acides aminés produits au cours de la germination et la vitesse de germination du maïs. Le suivi isotopique montre que l'Asp-¹⁵N est dégradé différemment en fonction des lignées. En effet, il est dégradé en méthionine et thréonine chez la lignée Io alors qu'il est dégradé en lysine et thréonine chez la lignée F2. Parallèlement, on observe une conversion de l'aspartate en glutamine, acide aminé de stockage et de transport, plus important chez la lignée F2 que chez la lignée Io. Les résultats issus de l'analyse de la composition en acides aminés ont montré que la lignée, qui accumule les acides aminés de la voie de l'aspartate, est aussi moins sensible à l'apport extérieur de ces derniers lors de la germination. Ceci confirme l'hypothèse que la teneur en acides aminés contrôlerait de manière directe ou indirecte la vitesse de germination.

L'ensemble des résultats nous a permis de proposer un schéma du fonctionnement du métabolisme de l'aspartate au cours des premières heures de la germination chez les deux lignées Io et F2 (fig. n°36).

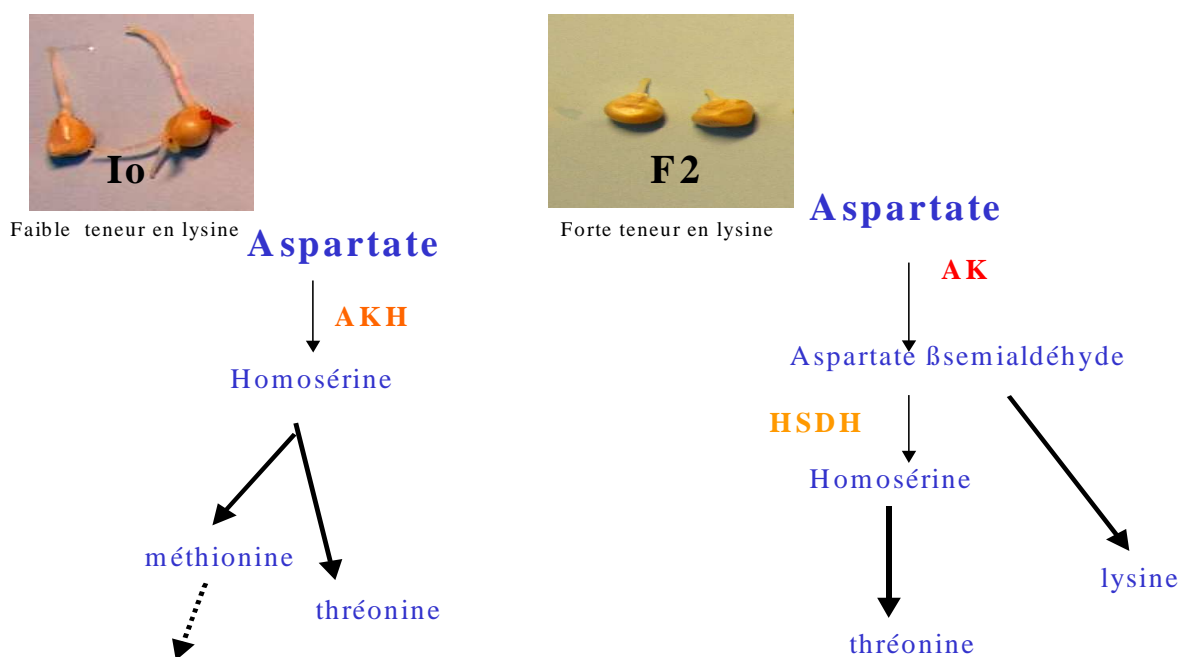
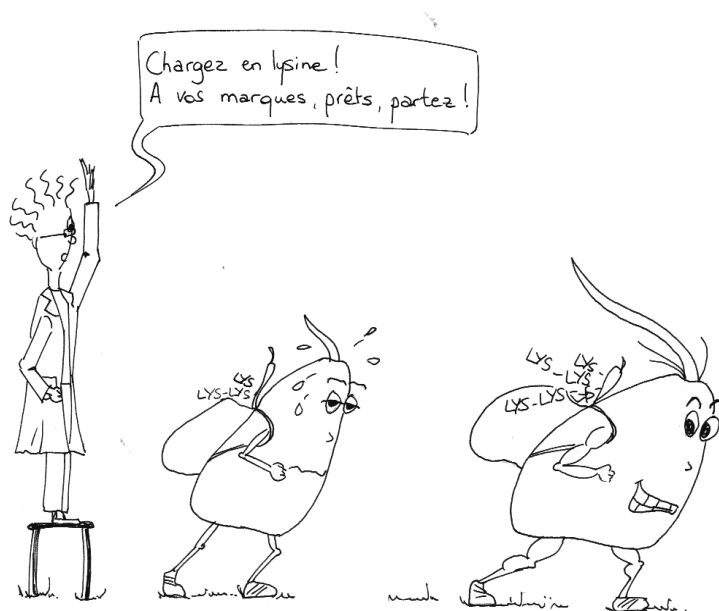


Figure 36 : Schéma des voies principales du métabolisme de l'aspartate au cours de la germination en fonction des lignées. AK : Aspartate kinase mono-fonctionnelle, AKH : Aspartate kinase bi-fonctionnelle, HSDH : Homosérine déshydrogénase (HSDH).

Les résultats issus de ce chapitre ont fait l'objet de deux articles. Le premier, publié dans la revue « Journal of Experimental Botany », caractérise la voie de l'aspartate au cours de la germination des géotypes Io et F2 (annexe n°2). Le deuxième, publié dans la revue « L'actualité Chimique », montre l'activité *in vivo* de l'aspartate kinase par l'utilisation du suivi isotopique (annexe n°3).

**Chapitre II : Recherche de QTLs impliqués dans
l'effet inhibiteur de la lysine sur la vitesse de
germination du maïs (*Zea mays*)**



INTRODUCTION

Découvrir les gènes impliqués dans la vitesse de germination et d'élongation de la racine ainsi que ceux impliqués dans les mécanismes qui modulent ces vitesses est un enjeu important pour la recherche fondamentale et pour les travaux de sélection et d'amélioration des plantes. En effet, la germination et l'élongation de la racine sont les premières étapes et les plus importantes pour l'établissement de la plante dans le milieu. Avec l'avènement des outils moléculaires, il est devenu possible de disséquer les bases génétiques et moléculaires d'un caractère agronomique et physiologique complexe par la détection de QTLs. La détection de QTLs correspond à la localisation des zones du génome impliquées dans le contrôle d'un caractère, à l'estimation de l'effet de ces zones sur le caractère ainsi que l'estimation de la part de la variabilité phénotypique qu'elles expliquent (Limami et de Vienne D, 2001). Plusieurs QTLs liés aux caractères agronomiques ont été trouvés chez le maïs (*Zea mays*) (Fracheboud *et al.*, 2004; Fracheboud *et al.*, 2002; Hund *et al.*, 2004; Limami *et al.*, 2002; Tuberosa *et al.*, 2002), chez *Arabidopsis* (Loudet *et al.*, 2003) et chez le riz (*Oryza sativa*) (Fujino *et al.*, 2004; Ishimaru *et al.*, 2004). Certains d'entre eux ont même été clonés chez le maïs (*zea mays*) (Doebley *et al.*, 1997), la tomate (*Lycopersicon esculentum*) (Foolad *et al.*, 1999; Frary *et al.*, 2000; Fridman *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2002) et le riz (*Oryza sativa*) (Andaya et Mackill, 2003; Yano *et al.*, 2000). En s'appuyant sur une étude QTL, la participation du métabolisme azoté dans la vitesse de germination et la croissance post-germinative a été étudiée dans le chapitre I. Parmi trois QTLs de vitesse de germination, deux ont été situés à proximité de trois gènes codant l'aspartate kinase : l'*ask2* et l'*akh2* sur le chromosome 2 et l'*akh1* sur le chromosome 4. L'étude d'expression de ces gènes au cours de la germination des lignées parentales a prouvé que (i) leur expression augmente avec l'imbibition (ii) le niveau d'expression est toujours plus important dans la lignée à germination rapide (iii) le gène *akh2*, qui court-circuite la voie de biosynthèse de la lysine, est celui qui présente la différence la plus importante entre les deux lignées parentales. De plus, la différence de germination entre les lignées Io (à germination rapide) et F2 (à germination lente) est accompagnée d'une différence au niveau du métabolisme de l'aspartate. L'analyse de l'évolution des acides aminés a mis en évidence, d'une part une différence dans le turnover des acides aminés au cours de la germination des deux lignées et d'autre part, une

accumulation des acides aminés de la voie de l'aspartate dans l'embryon de la lignée F2 à germination lente. L'étude du devenir du groupement azote de l'aspartate, par suivi isotopique, a montré une différence dans la dégradation de l'aspartate au cours des premières phases de la germination entre les deux lignées. L'aspartate est dégradé en méthionine et thréonine chez la lignée Io alors qu'il est dégradé en lysine et thréonine chez la lignée F2. En conclusion de ces derniers résultats, une hypothèse pour expliquer comment la vitesse de germination serait liée au métabolisme des acides aminés a été proposée. Le génotype F2 présenterait une vitesse de germination assez lente, du fait de l'effet inhibiteur de l'accumulation de lysine combiné à un déficit du métabolisme de la méthionine et de la thréonine. La lysine a un effet négatif sur la physiologie et le développement de la plante. Des études chez *Arabidopsis thaliana* ont montré que l'accumulation de lysine a un effet négatif sur la physiologie et la croissance de la plantule (Cattoir – Reynaerts *et al.*, 1981; Vauterin et Jacobs, 1994; Zhu et Galili, 2004). En effet la régulation fine de la teneur en lysine joue un rôle dans le développement et la croissance de nombreuses espèces ; de ce fait la teneur en lysine est toujours maintenue à un niveau assez stable (Ben-Tzvi Tzchori *et al.*, 1996). Parallèlement à ces données, la littérature montre qu'hormis un rôle dans la synthèse de protéine et l'initiation de la translation des ARNm, la méthionine et sa forme active la SAM sont impliquées dans des processus essentiels comme le transfert de groupement méthyle, la synthèse de polyamine et d'éthylène, ainsi que des événements de régulation comme la stimulation de l'activité de la Thréonine synthase (Hacham *et al.*, 2002; Maimann *et al.*, 2000). De nombreux travaux montrent qu'une modification dans la teneur en acides aminés de la voie de l'aspartate, en particulier de la lysine et de la méthionine, entraîne des dommages importants sur la croissance et le développement de la plante (Hacham *et al.*, 2002; Maimann *et al.*, 2000; Zhu et Galili, 2004). Par ailleurs, l'effet d'un apport extérieur de ces acides aminés sur la germination a été évalué chez les deux lignées Io et F2 (chapitre I). Il en ressort que les acides aminés ont un effet différent sur la germination (effet positif de la thréonine, effet négatif de la lysine et effet neutre de la méthionine) et que cet effet dépend du génotype. En effet la lignée F2, qui présente un fort taux de lysine et accumule le plus les acides aminés de la voie de l'aspartate, présente une sensibilité moins importante à l'apport extérieur de ces acides aminés.

La littérature relate uniquement le fait que la lysine joue un rôle physiologique important, indépendamment de son rôle dans la construction des protéines, mais aucun mécanisme n'a encore été mis en évidence. L'objectif de ce travail est de déterminer les bases

génétiqes de l'effet négatif de la lysine sur la vitesse de germination par une analyse QTL, afin de mettre en évidence les gènes, puis les voies sur lesquelles la lysine pourrait agir comme élément signal. Pour cela, une collaboration avec l'INRA a été établie afin d'obtenir une population en ségrégation nécessaire à l'analyse génétique. C'est une population de backcross avancés issue d'un croisement entre la lignée F2 commune à la première étude et une nouvelle lignée F334 qui se comporte comme Io en terme de vitesse de germination. L'expression des gènes codant les aspartate kinases a été caractérisée par qt-RT-PCR chez la lignée F334 à germination rapide en comparaison à la lignée Io. Ensuite, la vitesse de germination en présence de lysine a été comparée à la germination en condition contrôle et en présence de méthionine chez les lignées de backcross avancés afin de déterminer les QTLs généralistes de vitesse de germination et ceux spécifiquement liés à l'effet de la lysine.

RESULTATS

1- Germination et élongation de la racicule des lignées parentales F2 et F334

1. 1- Germination en condition normale

Les graines des lignées parentales F2 et F334 ont été mises à germer sur de l'eau dans des boîtes de Petri. Des courbes de germination ont été réalisées et sont présentées (fig. n°37a). L'analyse de la figure n°37a révèle que la lignée F334 germe plus vite que la lignée F2 lorsque la germination a lieu en condition contrôle. Le T50, qui correspond au temps nécessaire pour la germination de 50% des graines, est de 54 h pour la lignée F334 et 74 h pour la lignée F2.

La courbe d'imbibition représente la prise d'eau au cours du temps. La figure n°37b montre que, pendant les premières heures de la germination au sens strict, l'absorption d'eau est similaire chez les deux lignées F2 et F334.

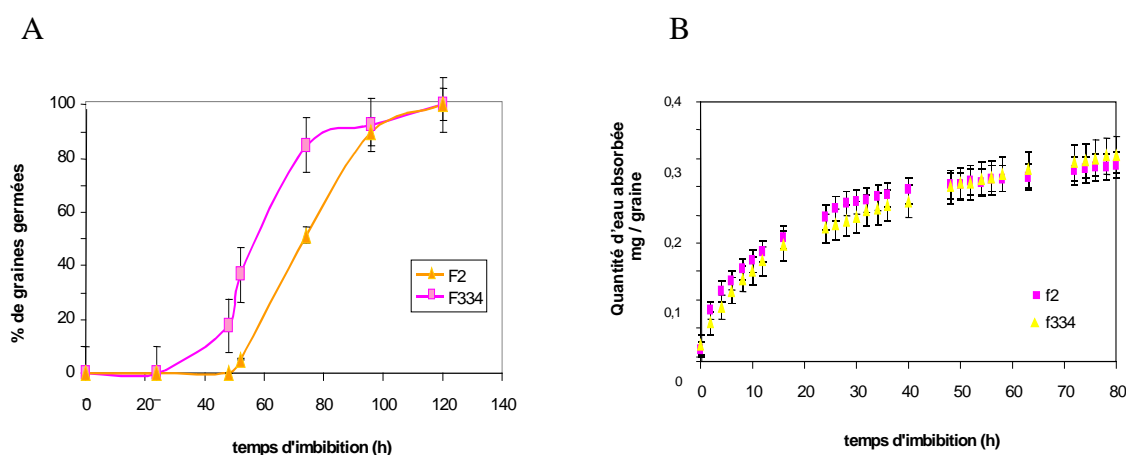


Figure 37 : Germination des lignées F2 et F334. Les graines de maïs ont été mises à germer à 20°C dans des boîtes de Petri contenant 5 ml d'eau stérile. **A** Courbe de germination. Le pourcentage de graines germées a été relevé à des heures régulières. **B**. Courbe d'imbibition. Le poids frais des graines a été mesuré toutes les 3h dans les premières phases de la germination. La quantité d'eau absorbée présentée correspond au poids frais moins le poids sec des graines. Les écarts-types ont été calculés à partir de trois répétitions de lot de 30 graines.

1. 2- Germination sur méthionine, thréonine et lysine

Les graines des lignées parentales F2 et F334 ont été mises à germer sur méthionine, thréonine et lysine 5mM dans des boîtes de Petri à 20°C. Des courbes de germination ont été réalisées et sont présentées (fig. n°38 a et b). L'analyse de la figure n°38 révèle que la germination sur méthionine est identique à la germination sur eau pour les lignées F334 et F2. En effet, le T50 est de 53 h pour la lignée F334 et 76 h pour la lignée F2. La germination sur thréonine est plus rapide que la germination en condition contrôle chez les deux lignées, le T50 est alors de 48 h pour la lignée F334 et 70 h pour la lignée F2. La lysine ralentit la germination des deux lignées. Le T50, lorsque la germination se déroule sur lysine, est de 82 h pour la lignée F334 et 79 h pour la lignée F2. On peut noter que les différences entre la germination sur thréonine et lysine et la germination en condition contrôle sont plus marquées chez la lignée F334 que chez la lignée F2. La germination et la croissance post-germinative de la lignée F2 sont moins sensibles à un apport extérieur de lysine et thréonine que celles de la lignée F334. Etant donné que la vitesse de germination n'est pas modifiée en présence de méthionine, dans la recherche de QTL de vitesse de germination, la méthionine est utilisée comme contrôle osmotique.

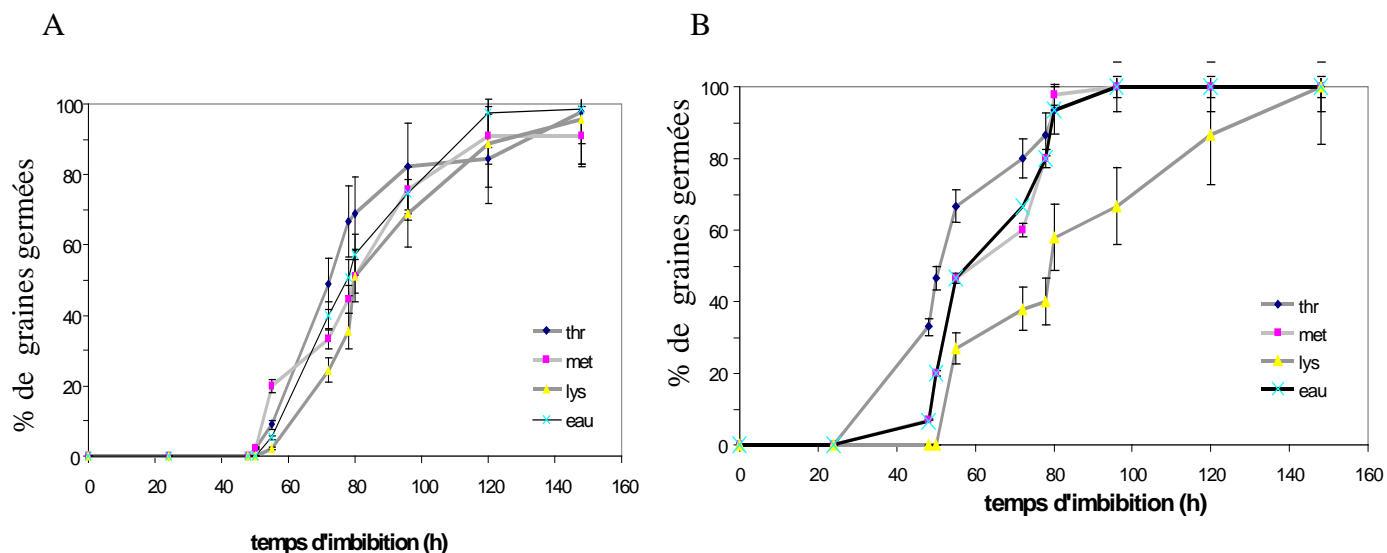


Figure 38 : Courbe de germination de la lignée F2 (A) et de la lignée F334 (B) en présence d'acides aminés. La germination a été effectuée avec 5ml d'eau, de lysine, de thréonine ou de méthionine à 5mM. Les écarts-types ont été calculés à partir de trois répétitions.

1. 3- Elongation de la racicule sur méthionine, thréonine et lysine

Des photos ont été prises après 124 h d'imbibition pour les expériences de germination menées en condition contrôle, en présence de méthionine, de thréonine ou de lysine. L'observation de la taille de la racicule des lignées F2 et F334 (fig. n°39) met en évidence l'effet des acides aminés sur l'élongation de la racicule. Les observations montrent que la thréonine et la méthionine ralentissent la germination mais surtout créent une variation de réponse entre les individus et que la lysine ralentit considérablement l'élongation de la racicule.

Dans ces trois conditions, une différence au niveau de l'élongation de la racicule entre les deux lignées est toujours observée ; il est donc possible de rechercher les bases génétiques expliquant cette différence.

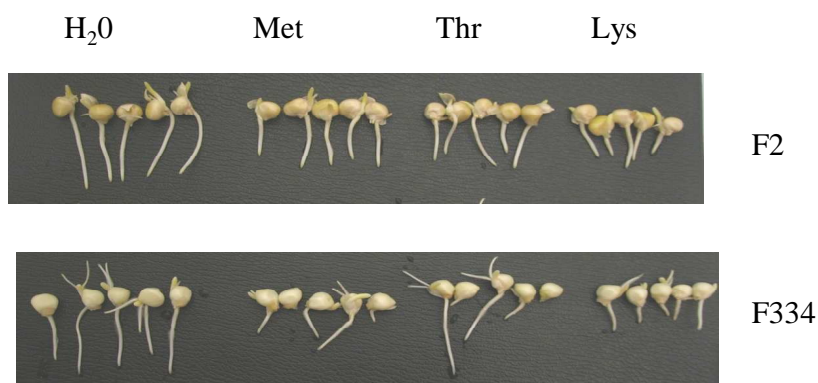


Figure 39 : Germination des graines des lignées F2 et F334 en présence d'acides aminés. La germination s'est déroulée en présence de 5ml d'eau, de lysine, de thréonine, de méthionine à 5 mM. Photographies prises après 124h d'imbibition

2- Polymorphisme des aspartate kinases entre les lignées F2 et F334

2. 1-Polymorphisme d'expression

Dans la première partie de ce travail, il a été montré que des différences de vitesse de germination entre deux lignées Io et F2 sont accompagnées de différences dans le

métabolisme de la voie de l'aspartate à travers des différences d'expression de gènes aspartate kinases et d'activités enzymatiques. Les lignées F2 et F334 germent à des vitesses différentes, existe-il un polymorphisme dans l'expression des aspartate kinases comme cela a été observé entre les lignées Io et F2 ? Afin d'y répondre, l'expression des 4 gènes d'aspartate kinases (*ask1*, *ask2*, *akh1* et *akh2*) a été analysée par qt-RT-PCR dans l'embryon des lignées parentales F2 et F334. Les résultats présentés figure n°40 montrent que l'expression des gènes *ask1* et *akh1* est relativement constante au cours de la germination, ceci chez les deux lignées F2 et F334 alors que l'expression des gènes *ask2* et *akh2* augmente au cours de la germination. Les résultats ont également montré que l'expression de 3 des 4 gènes est plus importante chez la lignée F334 que chez la lignée F2. Les résultats d'expression des gènes chez la lignée Io ont été reportés figure n°40 à titre indicatif, afin de permettre la comparaison entre les 3 lignées. Comme cela a été vu dans la première partie de la thèse, la lignée à germination rapide montre un niveau d'expression plus élevé que la lignée à germination lente.

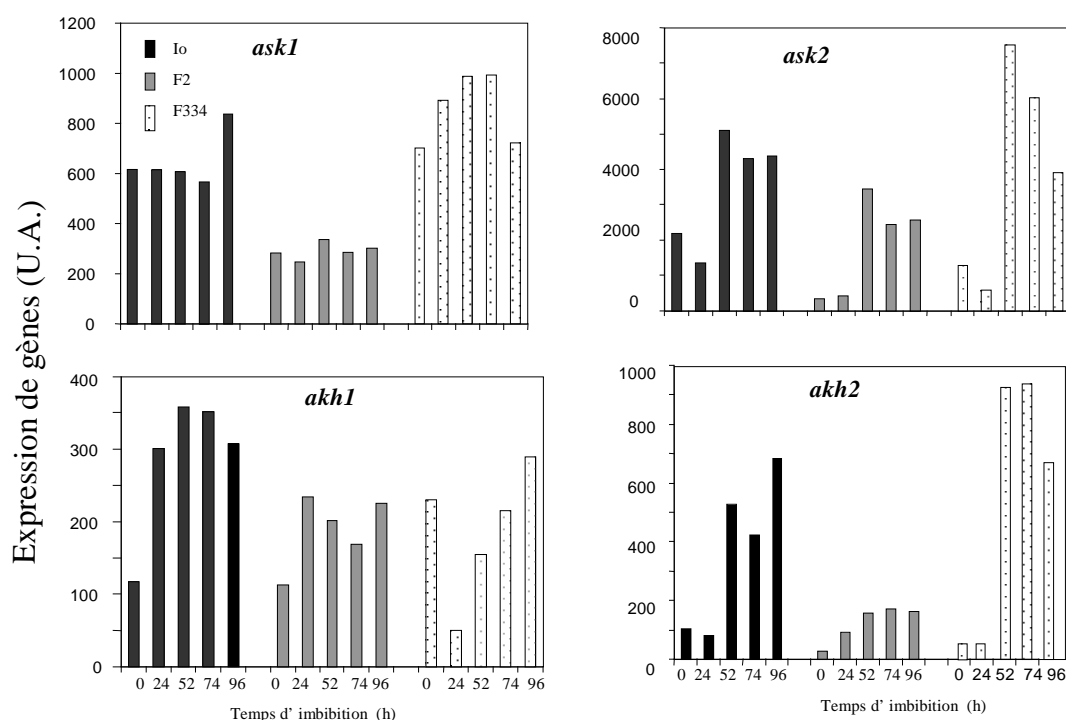


Figure 40 : Analyse par qt-RT-PCR de l'expression des gènes *ask1*, *ask2*, *akh1* et *akh2*.

L'étude est faite au cours de la germination de la lignée Io (noir), de la lignée F2 (gris) et de la lignée F334 (point noir) sur des ADNc dilués 4X.

2. 2- Polymorphismes de séquence

Afin de trouver du polymorphisme et de cartographier les gènes d'aspartate kinase sur la carte génétique de la population étudiée, ils ont été analysés chez les deux parents F2 et F334. Au cours de la première étude (chapitre I), les gènes *ask2*, *akh1* et *akh2* ont été retenus comme candidats pour expliquer la vitesse de germination. L'*ask2* et l'*akh2* sont très proches en terme de localisation sur le chromosome ; de ce fait, seul le clonage de l'*ask2* et de l'*akh1* a été envisagé.

La recherche de polymorphisme de séquence pour le gène *akh1* a été effectuée par une recherche de différence de taille des introns. La séquence de l'ADNc d'*akh1* est entièrement connue (annexe n°1). En utilisant les amorces spécifiques d'*akh1* sur ADNc et sur ADN génomique issus des deux lignées F2 et F334, un fragment de 600 pb et de 1,7 kb a été obtenu respectivement sur ADNc et sur ADN génomique (données non présentées). Entre les deux lignées aucune différence de taille n'a été mise en évidence. De ce fait, le clonage des produits PCR et leur séquençage ont été réalisés pour rechercher un polymorphisme de séquence. Toutefois, le clonage du fragment de 1,7 kb n'a pas abouti malgré les différentes méthodes tentées.

La recherche de polymorphisme de séquence pour le fragment *ask2* a été effectuée au niveau des zones UTR (untranslated region). Pour cela, des expériences de 3'RACE et 5'RACE ont été menées. Seul le fragment issu de la 3'RACE chez les deux lignées a été cloné avec succès. Des fragments de 322 pb chez F2 et de 326 pb chez F334 ont été obtenus (fig. n°41). Deux zones présentant des différences de séquence ont été mises en évidence grâce à un alignement de séquences par le logiciel Multalin (INRA, Toulouse) : l'une correspond à la substitution d'adénine en cytosine, et l'autre à la délétion de 4 nucléotides et à la substitution d'une cytosine en guanine. Ce polymorphisme a été utilisé pour déterminer des amorces spécifiques de l'*ask2* de chaque lignée.

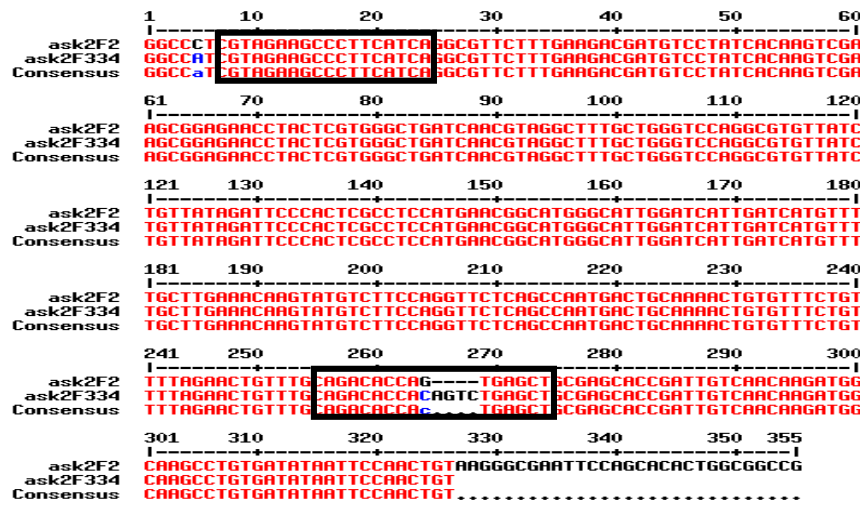


Figure 41 : Alignement des séquences clonées du gène *ask2* provenant des lignées F2 et F334. La zone de fixation des amorces utilisées pour le génotypages est matérialisée par un cadre noir.

2.3- Position de l'*ask2* sur la carte génétique

A partir du clonage de fragment d'aspartate kinase provenant des lignées F2 et F334, des amorces spécifiques discriminant les allèles des deux lignées ont été déterminées. La position des amorces sur la séquence clonée est présentée (fig. n°41).

Des PCR ont été réalisées sur les 280 lignées de BC2S3 en présence du couple d'amorces *ask2* qui permet de discriminer les allèles de la lignée parentale F2 et de la lignée parentale F334. Le produit PCR est un marqueur moléculaire dominant car il ne permet pas de discriminer les hétérozygotes (fig. n°42). L'analyse des électrophorèses a montré que 76% des lignées portaient des allèles homozygotes F2 ou hétérozygotes et 23% portaient les allèles homozygotes F334.

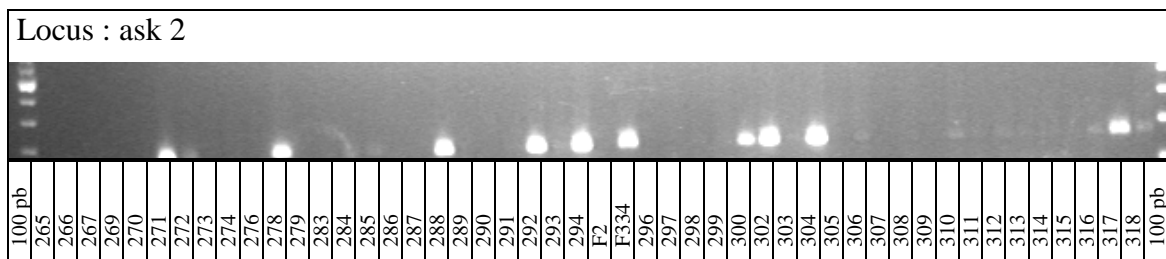


Figure 42 : Ségrégation des allèles *ask2* dans la population de BC2S5.

La carte obtenue à partir des 280 génotypes de la génération BC2S1 présente 134 marqueurs (dont 19 dominants) répartis sur 1550cM, soit une distance moyenne de 11,7cM entre deux marqueurs. Les données de la ségrégation des allèles d'*ask2* dans la population et l'utilisation des trois logiciels successifs (Mapmaker, Qmap et Joinmap) ont permis de positionner l'*ask2* sur le chr 3 à 108 cM, entre les marqueurs bnlg1035 et umc1027 (fig. n°43).

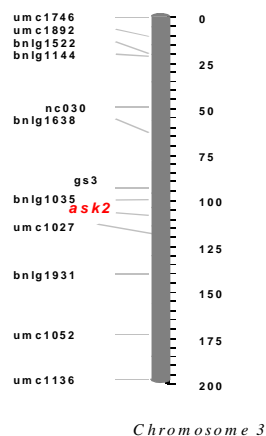


Figure 43 : Positionnement du gène *ask2* sur le chromosome 3. Carte génétique établie à partir de la population BC2S3, issue du croisement entre F2 et F334.

3- Distribution des caractères

La lignée F334 possède de très mauvaises valeurs agronomiques (fertilité, rendement) lorsqu'elle est cultivée en Europe. Le stock de graines, provenant des lignées de backcross avancés issues du croisement entre la lignée F2 et la lignée F334, est très limité. Il a fallu faire des choix sur les caractères à étudier, afin de limiter la consommation en graines. De ce fait, la vitesse de germination a été testée en condition contrôle, en présence de méthionine et de lysine mais pas en présence de thréonine. L'élongation de la racine illustre la capacité à investir rapidement le milieu après la germination. Le caractère élongation, correspondant à la taille de la racine par rapport au temps écoulé entre la percée de la racine et 124h d'imbibition, a également été mesuré au cours de l'expérience de germination en complément du caractère vitesse de germination. Le Poids a été mesuré comme caractère supplémentaire pouvant apporter des éléments de discussion. Le poids d'une semence peut être lié au pool de sucres, d'acides aminés et de lipides qu'elle contient. A priori, il existe une relation entre la

germination et les réserves du grain sec et par conséquent il existe sans doute une liaison entre la vitesse de germination et le poids.

La détection de QTL n'est réalisable que pour des caractères quantitatifs, c'est-à-dire qui ont une distribution continue au sein de la population étudiée. La distribution des caractères vitesse de germination et élongation de la racicule en condition contrôle, sur méthionine et sur lysine a été analysée au sein des 125 lignées de BC2S5.

3. 1- Le poids

Le distribution du caractère poids dans la population de 125 lignées de BC2S5 suit une loi normale (fig. n°44). La dispersion du caractère s'étend de 0,1 g à 0,3 g par grain en fonction des lignées.

3. 2- La vitesse de germination

Les distributions des caractères, (T50) en condition contrôle, (T50) sur méthionine et (T50) sur lysine, suivent une loi normale. La dispersion des caractères est de 70 -170 pour le (T50) en condition contrôle, 90 - 200 pour le T50 sur méthionine, de 80 - 210 pour le (T50) sur lysine. On peut constater un éclatement de la distribution du caractère en présence de méthionine et de lysine (fig. n°44).

3.3- L'élongation de la racicule

La distribution du caractère élongation de la racicule (E.) en condition contrôle, en présence de méthionine et de lysine suit une loi normale. La dispersion des caractères est de 10 - 60 mm/h pour l' E. en condition contrôle, 10 - 40 pour l'E. sur méthionine, de 0,1 - 40 pour l'E. sur lysine. On peut constater un éclatement de la distribution du caractère, mais surtout un déplacement de la distribution vers des valeurs plus petites en présence de lysine (fig. n°44).

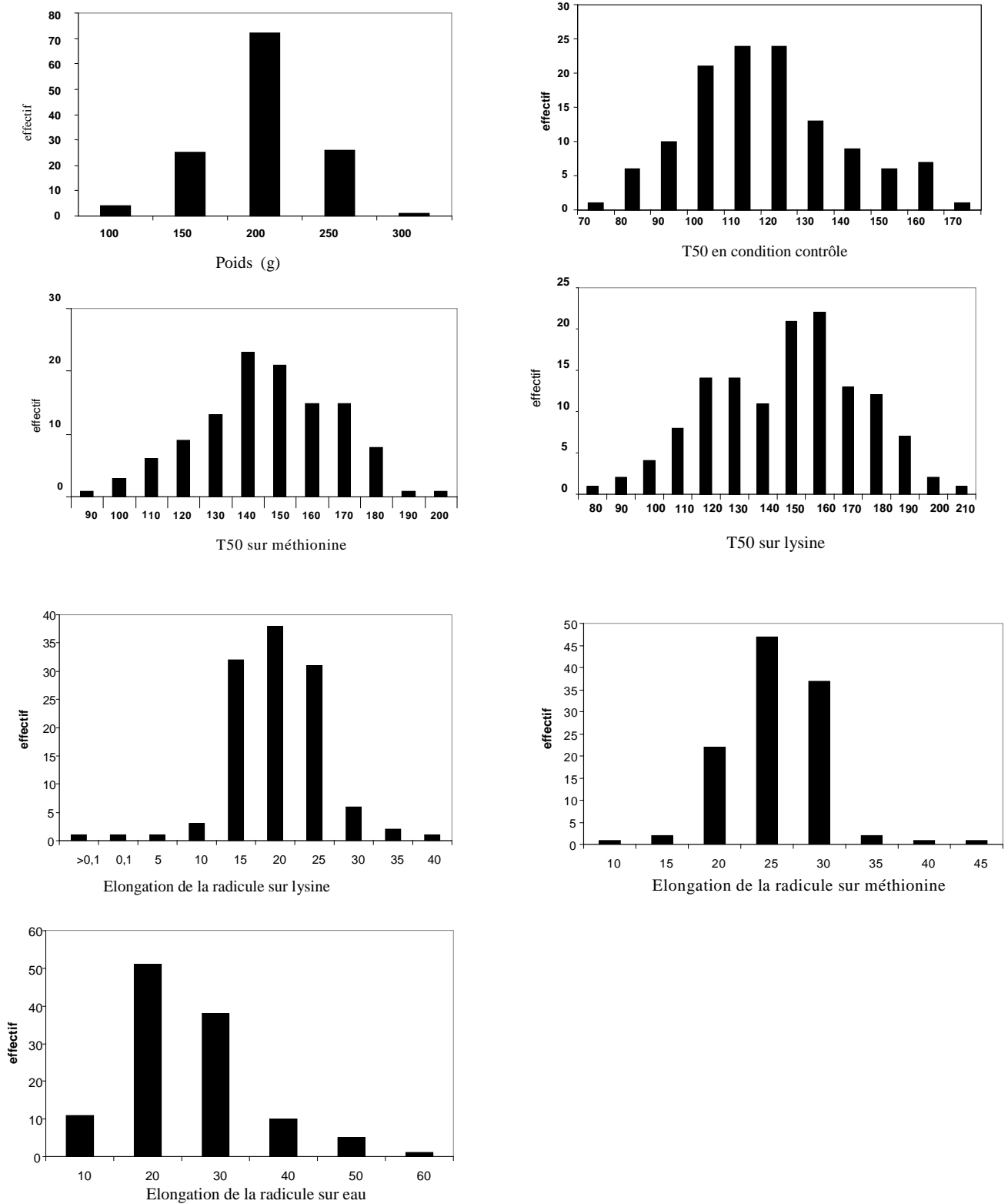


Figure 44 : Distribution des caractères au sein de la population.

4- Corrélation entre les caractères

Le coefficient de corrélation r^2 est déterminé grâce au logiciel Excel. La propriété fondamentale du coefficient de corrélation (r^2) est utilisée afin de connaître les liaisons éventuelles entre deux caractères. La corrélation peut être exprimée en pourcentage lorsque r^2 est multiplié par 100.

L'ensemble des résultats issus de l'analyse des corrélations entre caractères pris à deux est présenté tableau n°V.

Tableau V: Corrélation entre caractères pris deux à deux.

	Poids	T50 Condition contrôle	T50 sur méthionine	T50 Sur lysine	Elongation en condition contrôle	Elongation sur méthionine	Elongation sur lysine
Poids		0,20	0,16	0,13	0,0019	0,0064	0,0002
T50 en Condition contrôle			0,48	0,58	0,1376	0,0026	0,0131
T50 sur méthionine				0,64		4E-05	
T50 sur lysine							0,005
Elongation en condition contrôle						0,0127	9E-05
Elongation sur méthionine							0,019
Elongation sur lysine							

Le coefficient de corrélation entre germination en condition contrôle et sur méthionine est $r^2 = 0,48$; ceci signifie qu'il existe 48% de la variation observée lors de la germination en condition contrôle et en présence de méthionine qui sont expliqués par les mêmes phénomènes. Le coefficient de corrélation entre germination en condition contrôle et la germination sur lysine est $r^2 = 0,58$. De manière générale, il existe une corrélation assez

importante entre les germinations dans les différentes conditions. En effet, les résultats montrent que pour des conditions prises deux à deux il y a une corrélation de 48 à 64%.

Le poids est corrélé de 13 à 20% avec la germination dans les différentes conditions. Par contre le poids n'est pas corrélé avec les élongations de radicules sur eau, méthionine ou lysine.

Le coefficient de corrélation entre élongation en condition contrôle et l'élongation sur méthionine est de $r^2 = 0,013$. Il est de $r^2 = 9^{E-05}$ entre élongation en condition contrôle et l'élongation sur lysine et de $r^2 = 0,0191$ entre élongation sur méthionine et l'élongation sur lysine. L'analyse des coefficients de corrélation effectuée en observant l'élongation sur l'eau, la lysine ou la méthionine montre qu'il n'existe pas de liaison entre l'élongation dans les différentes conditions.

Les corrélations entre germination et élongation ont montré qu'il n'existe pas de corrélation ou du moins une très faible corrélation entre la germination et l'élongation.

5- L'analyse de QTLs

5. 1- Détection des QTLs de poids

Un QTL (poids), qui explique environ 11% de la variabilité du caractère, a été détecté par l'analyse QTL. Il est localisé sur le chr 3 (180 cM) proche du marqueur umc1052. L'allèle situé dans cette zone, provenant de la lignée F334, apporte un bénéfice d'environ 30g aux poids de mille grains aux lignées possédant un fond génétique F2.

5. 2- Détection des QTLs de vitesse de germination (T50)

La vitesse de germination est déterminée par le T50, temps nécessaire à la germination de 50% des graines. Ce caractère représente aussi la capacité à induire la reprise de la respiration et du métabolisme à travers la mobilisation des réserves carbonées et azotées. 12 QTLs (T50) en condition contrôle, méthionine et lysine avec un LOD score > 2.05 ont été détectés sur les chr 1, 3 et 4.

5. 2. 1- QTLs de vitesse de germination en condition contrôle (eau 20°C)

Les zones impliquées dans le contrôle du caractère vitesse de germination en condition contrôle ont été détectées sur les chr 1, 3 et 4 (Tableau n°VI). Le QTL localisé sur le chr 1 est positionné à 170 cM, proche du marqueur bnlg1055 ; il explique environ 7% de la variabilité phénotypique. Le QTL localisé sur le chr 3 est positionné à 170 cM, proche du marqueur umc1052 ; il explique environ 19% de la variabilité phénotypique. Les QTLs localisés sur le chr 4 sont positionnés à 44 cM au marqueur nc004 et à 102 cM proche du marqueur bnlg2291 ; ils expliquent respectivement 13 et 20 % de la variabilité phénotypique.

L'analyse de l'effet des allèles permet de mettre en évidence que l'allèle F334 du QTL localisé sur le chr 1 confère une variation de (-9h) dans un fond génétique F2, celui localisé sur le chr 3 confère une variation de (+12h), et ceux du chr 4 positions (a et b) une variation de (-10h) et (-11h) respectivement.

5. 2. 2- QTLs de vitesse de germination sur méthionine

La germination sur la méthionine sert de contrôle osmotique ; en effet la molarité est la même que pour la germination sur lysine. De plus, les tests de germination montrent que la méthionine ne modifie pas la vitesse de germination par rapport au contrôle eau.

Les zones impliquées dans le contrôle du caractère vitesse de germination sur méthionine ont été détectées sur les chr 1, 3 et 4 (Tableau n°VI). Le QTL localisé sur le chr 1 est positionné à 170 cM, proche du marqueur bnlg1055 ; il explique environ 8% de la variabilité phénotypique. Le QTL localisé sur le chr 3 est positionné à 174 cM, proche du marqueur umc1052 ; il explique environ 10% de la variabilité phénotypique. Les QTLs localisés sur le chr 4 sont positionnés à 48 cM, proche du marqueur nc004 et à 102 cM, proche du marqueur bnlg2291 ; ils expliquent respectivement 10 et 16 % de la variabilité phénotypique. L'analyse de l'effet des allèles permet de mettre en évidence que l'allèle F334 du QTL localisé sur le chr 1 confère une variation de (-9,7h) dans un fond génétique F2, celui du chr 3 confère une variation de (+14h), et ceux du chr 4 en position (a et b) une variation de (-11h) et (-17h) respectivement.

5. 2. 3- QTLs de vitesse de germination sur lysine

La vitesse de germination sur la lysine est ralentie par rapport à la germination sur eau ou méthionine. Cette condition a pour but de mettre en évidence les zones du génome impliquées d'une part dans la réponse à un apport extérieur de lysine et d'autre part dans la réponse à une condition qui provoque un ralentissement de germination.

Les zones impliquées dans le contrôle du caractère vitesse de germination sur lysine ont été détectées sur le chr 1 et 4 (Tableau n°VI). Le QTL localisé sur le chr 1 est positionné à 170 cM, proche du marqueur bnlg1055 ; il explique environ 6% de la variabilité phénotypique. Les QTLs localisés sur le chr 4 sont positionnés à 48 cM, proche du marqueur nc004, à 100 cM proche du marqueur bnlg2291 et à 152 cM proche du marqueur bnlg1337 ; ils expliquent respectivement 15, 13 et 12% de la variabilité phénotypique. L'analyse de l'effet des allèles permet de mettre en évidence que l'allèle F334 du QTL localisé sur le chr 1 confère une variation de (-11h) dans un fond génétique F2, et ceux du chr 4 en position (a, b et c) confèrent une variation de (-19h) (-19h) et (-14h) respectivement.

Tableau VI : QTLs putatifs.

Caractère	chr	Localisation		Intervalle de confiance	LOD	Effet (h)	R ² %
		Marqueur	distance cM				
Poids	3	umc1052	180	166-194	3,02	+27.81	10,9
T50 en condition contrôle	1	bnlg1055	170	160-180	2,24	- 9	7,3
	3	umc1052	170	158-186	2,75	+ 12	18,9
	4	nc004	44	30-54	2,29	- 10	13,3
	4	bnlg2291	102	94-116	2,35	- 11	19,9
T50 sur méthionine	1	bnlg1055	170	164-188	2,06	- 9.70	8,0
	3	umc1052	174	158-190	2,52	+ 14	9,6
	4	nc004	48	34-64	4,30	- 11	10,5
	4	bnlg2291	102	100-108	4,43	- 17	16,2
T50 sur lysine	1	bnlg1055	170	160-186	2,46	- 11	6,4
	4	Nc004	48	34-54	4,34	- 19	14,6
	4	bnlg2291	100	88-102	3,95	- 19	12,8
	4	bnlg1337	152	146-156	3,16	- 14	11,6

5. 3- Détection des QTLs d'élongation de la racicule

5. 3. 1- QTLs d'élongation de la racicule en condition contrôle (eau 20°C)

Les zones impliquées dans le contrôle du caractère élongation de la racicule en condition contrôle ont été détectées sur le chr 2 et 5 (tableau n°VII). Le QTL localisé sur le chr 2 est positionné à 136 cM, proche du marqueur bnlg1721 ; il explique environ 9% de la variabilité phénotypique. Le QTL localisé sur le chr 5 est positionné à 146 cM, proche du marqueur umc1792 ; il explique environ 11% de la variabilité phénotypique. L'analyse de l'effet des allèles permet de mettre en évidence que l'allèle F334 du QTL localisé sur le chr 2 confère une variation de (+0.0041mm/h) et celui du chr 5 une variation de (+0.005mm/h) dans un fond génétique F2.

5. 3. 2- QTLs d'élongation de la racicule sur méthionine

La zone impliquée dans le contrôle du caractère élongation de la racicule sur méthionine a été détectée sur le chr 1 (tableau n°VII). Elle est positionnée à 40 cM, proche du marqueur bnlg439 et explique environ 9% de la variabilité phénotypique. L'analyse de l'effet des allèles permet de mettre en évidence que l'allèle F334 de ce QTL confère une variation de (+0.42mm/h) dans un fond génétique F2.

5. 3. 3- QTLs d'élongation de la racicule sur lysine

Les zones impliquées dans le contrôle du caractère élongation de la racicule sur lysine ont été détectées sur le chr 7 et 10 (tableau n°VII). Le QTL localisé sur le chr 7 est positionné à 90 cM, proche du marqueur umc1112 ; il explique environ 12% de la variabilité phénotypique. Les QTLs localisés sur le chr 10 sont positionnés à 44 cM, proche du marqueur bnlg1037.2 et à 68 cM, proche du marqueur umc1246 ; ils expliquent chacun environ 12% de la variabilité phénotypique. L'analyse de l'effet des allèles permet de mettre en évidence que l'allèle F334 du QTL localisé sur le chr 7 confère une variation de (-0.92mm/h) et ceux du chr 10 une variation de (-0.96mm/h et -0.82mm/h) dans un fond génétique F2.

Tableau VII : QTLs Putatifs

Caractère	chr	localisation		Intervalle de confiance	LOD	Effet (mm/ h)	R ² %
		Marqueur	distance cM				
E. en condition contrôle	2	bnlg1721	136	126-146	2,55	+ 0,0041	9,4
	5	umc1792	146	140-152	2,88	+ 0,0050	10,6
E. sur méthionine	1	bnlg439	40	34-50	2,44	+ 0,42	9,3
E. sur lysine	7	umc1112	90	84-96	3,21	- 0,92	12,0
	10	bnlg1037.2	44	34-50	3,32	- 0,96	12,3
	10	umc1246	68	66-70	3,35	- 0,82	12,5

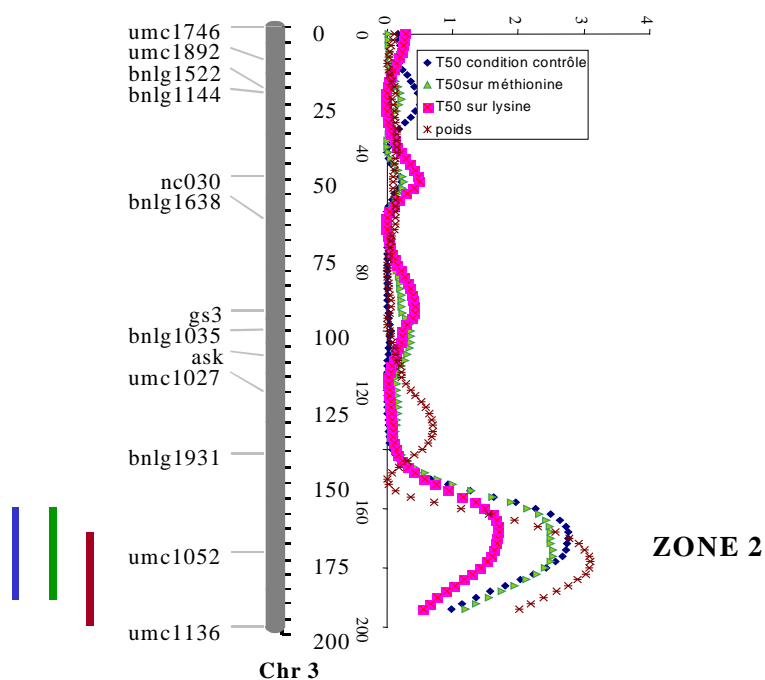
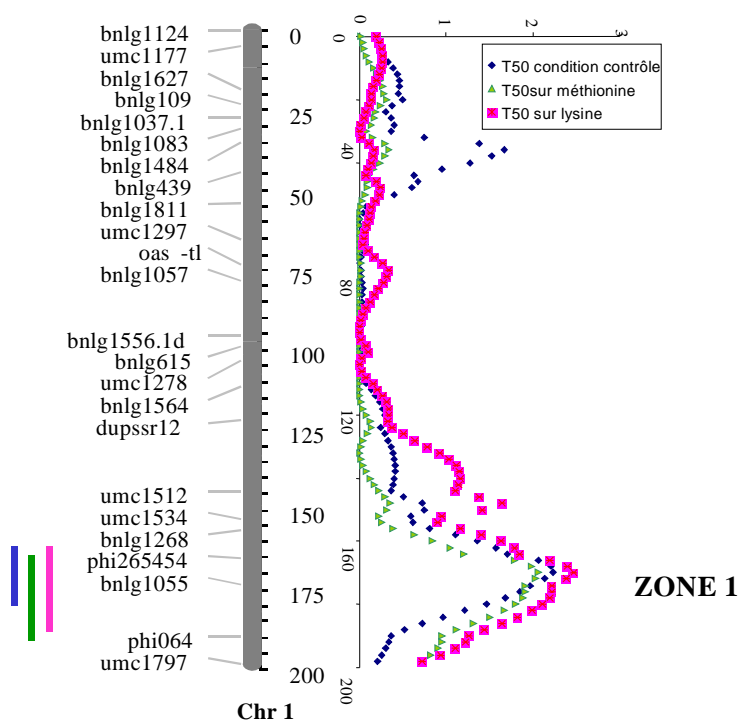
6- Recherche de gènes candidats

La recherche des gènes candidats qui peuvent expliquer les QTLs a été effectuée en listant les gènes localisés dans l'intervalle de ces derniers. Les QTLs qui coïncident entre eux sont regroupés en zone de 1 à 4 (fig. n°45).

Les **zones 1, 3 et 4**, positionnées sur le chr 1 proche du marqueur bnlg1055, sur le chr 4 proche du marqueur Nc004 et sur le chr 4 proche du marqueur bnlg1444, ont été identifiées comme des zones impliquées à la fois dans le caractère germination en condition contrôle, germination sur méthionine et germination sur lysine. La **Zone 2**, positionnée sur le chr 3 proche du marqueur umc1052, a été identifiée comme une zone impliquée à la fois dans le caractère poids, germination en condition contrôle et germination sur méthionine. Dans

chacune des zones une vingtaine de gènes a été localisée : leur rôle dans la cellule ainsi que leur numéro d'accèsion à GenBank ont été reportés dans le tableau n°VIIIa, b, c et d.

Un QTL n'appartient pas à une zone ; il s'agit d'un QTL (T50 sur lysine) localisé sur le chr 4 proche du marqueur bnlg1337. Dans l'intervalle de ce QTL 14 gènes ont été localisés tableau n°VIIIe.



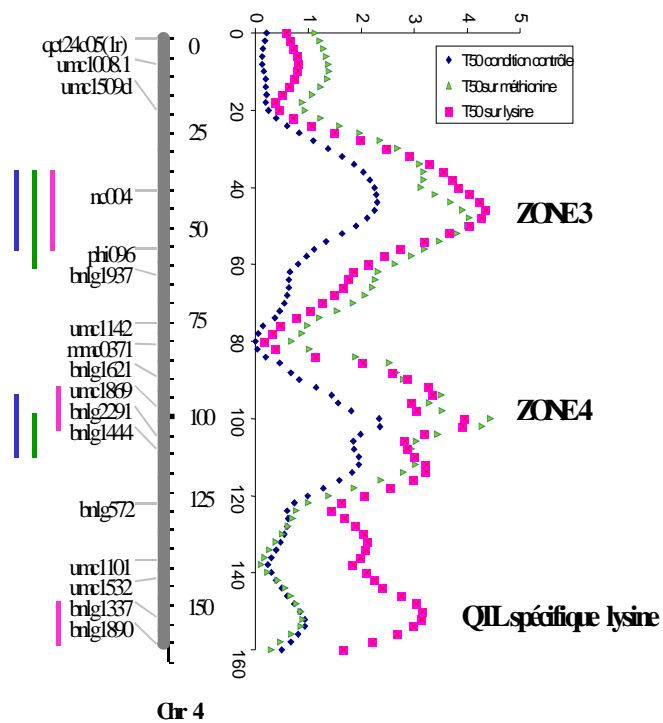


Figure n°45 : Co-localisation des QTLs. Seuls les chromosomes 1, 3 et 4 sont représentés. A gauche : les QTLs ; A droite : l'évolution des LODs le long du chromosome.

Tableau n°VIIIa : Liste des gènes co-localisant avec les QTL de la Zone 1

Zone 1 Chromosome 1 (bnlg1055)	Fonction / métabolisme	Carte de référence	Genbank accession
ADP GLUCOSE PYROPHOSPHORYLASE	Métabolisme des sucres	IBM050110	CF039793
CELL DIVISION CONTROL	Division cellulaire	IBM2 neighbors	
CELLULOSE SYNTHASE 6	Paroi cellulaire	IBM050110	CF033485
CYTOSOLIC GLYCERALDEHYDE 3 P DESHYDROGENASE	Métabolisme carboné	IBM2 neighbors	-----
DWARF 8	Mutant (taille de la plant)	IBM2 neighbors	-----
GLYCOGEN PHOSPHORYLASE	Métabolisme des sucres	IBM2 neighbors	-----
GLUTAMATE DECARBOXYLASE (GAD)	Métabolisme des acides aminés	IBM050110	CD972112
GRS-LIKE	Récepteur	IBM2 neighbors	-----
HEAT SHOCK PROTEIN, DNAJ	Protection	IBM2 neighbors	-----
METHYLTRANSFERASE	Putative RNA hélicase	IBM050110	CX129522
PROTEIN HAVING FLOWERING REGULATING ACTIVITY	Régulation	IBM2 neighbors	-----
GLUCOSE 6 P ISOMERASE	Métabolisme des sucres	IBM050110	
ALDEHYDE OXIDASE	Métabolisme des sucres	IBM050110	
GLUTAMINE DESHYDROGENASE 1	Métabolisme des acides aminés	IBM2 neighbors	-----
GLUCOSE 6 DESHYDROGENASE	Métabolisme des sucres	IBM050110	
PECTATE LYASE PRECURSOR SUCROSE SYNTHASE (SH1)	Métabolisme des sucres	IBM2 neighbors	-----
TRANSCRIPTION FACTOR LIKE	Facteur de transcription	IBM2 neighbors	-----

Tableau n°VIIIb : Liste des gènes co-localisant avec les QTL de la Zone 2

Zone 2 Chromosome 3 (umc1052)	Fonction / métabolisme	Carte de référence	Genbank accession
adenine nucleotide translocator1 ANT	Récepteur./ transporteur	IBM2 neighbors	-----
AUXIN RESPONSE FACTOR	Régulation de la transcription	IBM050110	AI665484 / CD984879
CHLOROPHYLL A/B BINDING PROTEIN	photosynthèse	IBM050110	CF028182
TRANSCRIPTION FACTOR BZIP	Putative G box binding factor 8	IBM050110	CX129476
TRANSCRIPTION FACTOR	Facteur de transcription	IBM050110	CD975729
Ubiquitin conjugating enzyme UCE	-----	IBM2 neighbors	-----
ADP GLUCOSE PYROPHOSPHORYLASE, ENDOSPERM (mutant: SHRUNKEN2)	Métabolisme des sucres	IBM2 neighbors	-----
40S ribosomal protein	Liaison ARN	IBM2 neighbors	-----
MALATE DESHYDROGENASE 3 ribosomal protein	Sucre (formation oxaloacétate)	IBM2 neighbors	-----
ketol-acid reductoisomerase1	Métabolisme des acides aminés	IBM2 neighbors	-----
GLOBULIN	Réserve protéique	IBM2 neighbors	-----
CARBONIC ANHYDRASE	Métabolisme du carbone	IBM2 neighbors	-----

Tableau n°VIIIc : Liste des gènes co-localisant avec les QTL de la Zone 3

Zone 3 Chromosome 4 (nc004)	Fonction / métabolisme	Carte de référence	Genbank accession
1-ACYL-GLYCEROL-3-PHOSPHATE ACYLTRANSFERASE,	Métabolisme des lipides	IBM050110	CF062436
ACONITASE 1	Métabolisme des sucres	IBM2 neighbors	-----
ADENOSYLHOMOCYSTEINASE LIKE	Métabolisme des acides aminés	IBM050110	CF018380
ADH2	détoxication	IBM2 neighbors	-----
adenosyl homocysteine hydrolase, ahh	Métabolisme des acides aminés	IBM2 neighbors	-----
basal layer antifungal protein2	-----	IBM2 neighbors	-----
BETA-5 TUBULIN	Liaison ADN	IBM2 neighbors	-----
BETL2 PROTEIN PRECURSOR (BASAL ENDOSPERM TRANSFER LAYER)	-----	IBM050110	CD979148
brown midrib3 : BM3	Mutant (Méthyltransferase, affecte la composition en lignine)	IBM2 neighbors	-----
chaperone DNA J homolog 1 CDJ	Protection ADN	IBM2 neighbors	-----
CHLOROPHYLL A/B-BINDING PROTEIN	photosynthèse	IBM050110	CF025760
Cinteotl4 : CIN4 elts transposable	-----	IBM2 neighbors	-----
floury2	Mutant (augmentation de la teneur en lysine)	IBM2 neighbors	-----
GLUCOSE 4 EPIMERASE	Métabolisme des sucres	IBM050110	CF005765
NEUTRAL INVERTASE	Signalisation des sucres	IBM050110	CX129445
oxygen evolving complex OEC23	Photosynthèse	IBM2 neighbors	-----
ZM O-METHYLTRANSFERASE ZRP4	Méthyltransférase	IBM2 neighbors	-----
RIBOSOME RECYCLING FACTOR	-----	IBM050110	CX129484
RNA HELICASE PRH75	RNA hélicase	IBM050110	CX129545
SPHINGOSINE KINASE	Métabolisme des lipides	IBM050110	CX129540
RNA POLYMERASE SIGMA FACTOR 1	ARN	IBM050110	CF026428
TRANSCRIPTION FACTOR LIKE	Facteur de transcription	IBM2 neighbors	-----
zein alpha protein1 ZP1 / zein protein ZPL1	-----	IBM2 neighbors	-----

Tableau n°VIII d : Liste des gènes co-localisant avec les QTL de la Zone 4

Zone 4 Chromosome 4 (bnlg2291)	Fonction / métabolisme	Carte de référence	Genbank accession
AQUAPORIN ZMPIP2-6	-----	IBM2 neighbors	-----
CDPK (CALCIUM DEP. PROTEIN KINASE)	Régulation / Signalisation	IBM050110	CF037259
GLUTAMINE SYNTHETASE 5	Métabolisme des acides aminés	IBM2 neighbors	-----
HISTONE 2B HIS2B	Liaison ADN	IBM2 neighbors	-----
PYRUVATE DEHYDROGENASE 1	Métabolisme carboné	IBM2 neighbors	-----
ser/thr PROTEIN PHOSPHATASE 1	Phosphorylation/déphosphorylation	IBM2 neighbors	-----
PUTATIVE RECEPTOR PROTEIN KINASE	Phosphorylation/déphosphorylation	IBM2 neighbors	-----
ribosomal protein L17	-----	IBM2 neighbors	-----
SER/THR PROTEIN KINASE-LIKE	Phosphorylation/déphosphorylation	IBM050110	AI668267
SUCROSE SYNTHASE (FRAGMENT) ZEA MAYS	Métabolisme des sucres	IBM050110	CX129456
tousled protein kinase1 TLK	-----	IBM050110	-----
TRANSCRIPTION FACTOR ZINC FINGER	Facteur de transcription	IBM050110	CD975734
trigonelline1	-----	IBM2 neighbors	-----
zea agamous3	Mutant (teneur en protéine et structure de l'épi)	IBM2 neighbors	-----
ZEA FERREDOXIN--NITRITE REDUCTASE, CHLOROPLAST PRECURSOR	Métabolisme azoté	IBM050110	AI861177
ZEA RACA SMALL GTP BINDING PROTEIN LIKE	-----	IBM050110	CD995866

Tableau n°VIIIe : Liste des gènes co-localisant avec le QTL T50 spécifique lysine

QTL spécifique lysine Chromosome 4 (bnlg1337)	Fonction / métabolisme	Carte de référence	Genbank accession
MITOGEN ACTIVATED PROTEIN KINASE	Division cellulaire	IBM050110	CX129487
ADP GLUCOSE PYROPHOSPHORYLASE CELL DIVISION CONTROL PROTEIN 2 HOMOLOG 2 LIKE	Métabolisme des sucres	IBM050110	CF039793
CYSTATHIONINE BETA-LYASE	Métabolisme des acides aminés	IBM050110	CF029033
EUKARYOTIC INITIATION FACTOR 3H1 SUBUNIT LIKE	Facteur de transcription	IBM050110	AI978038
Invertase NADH DEHYDROGENASE	Signalisation des sucres	IBM050110	CF033597 / BE123248
PUTATIVE CALMODULIN-BINDING PROTEIN	Régulation activité enzymatique	IBM2 neighbors	-----
PYROPHOSPHATASE	Régulation: Phosphorylation/déphosphorylation	IBM050110	CD973886
RACB SMALL GTP BINDING PROTEIN	Architecture de la paroi cellulaire	IBM2 neighbors	-----
SHAGGY LIKE PROTEIN KINASE	Voie de signalisation	IBM2 neighbors	-----
SUCROSE SYNTHASE	Métabolisme des sucres	IBM050110	CD984732
telomere associated sequence TAS10	-----	IBM2 neighbors	-----
ubiquitin UBI	-----	IBM2 neighbors	-----
H ⁺ -PYROPHOSPHATASE MRNA, PARTIAL CDS	Régulation: Phosphorylation/déphosphorylation	IBM2 neighbors	-----
RACD SMALL GTP BINDING PROTEIN	Architecture de la paroi cellulaire	IBM2 neighbors	-----

DISCUSSION

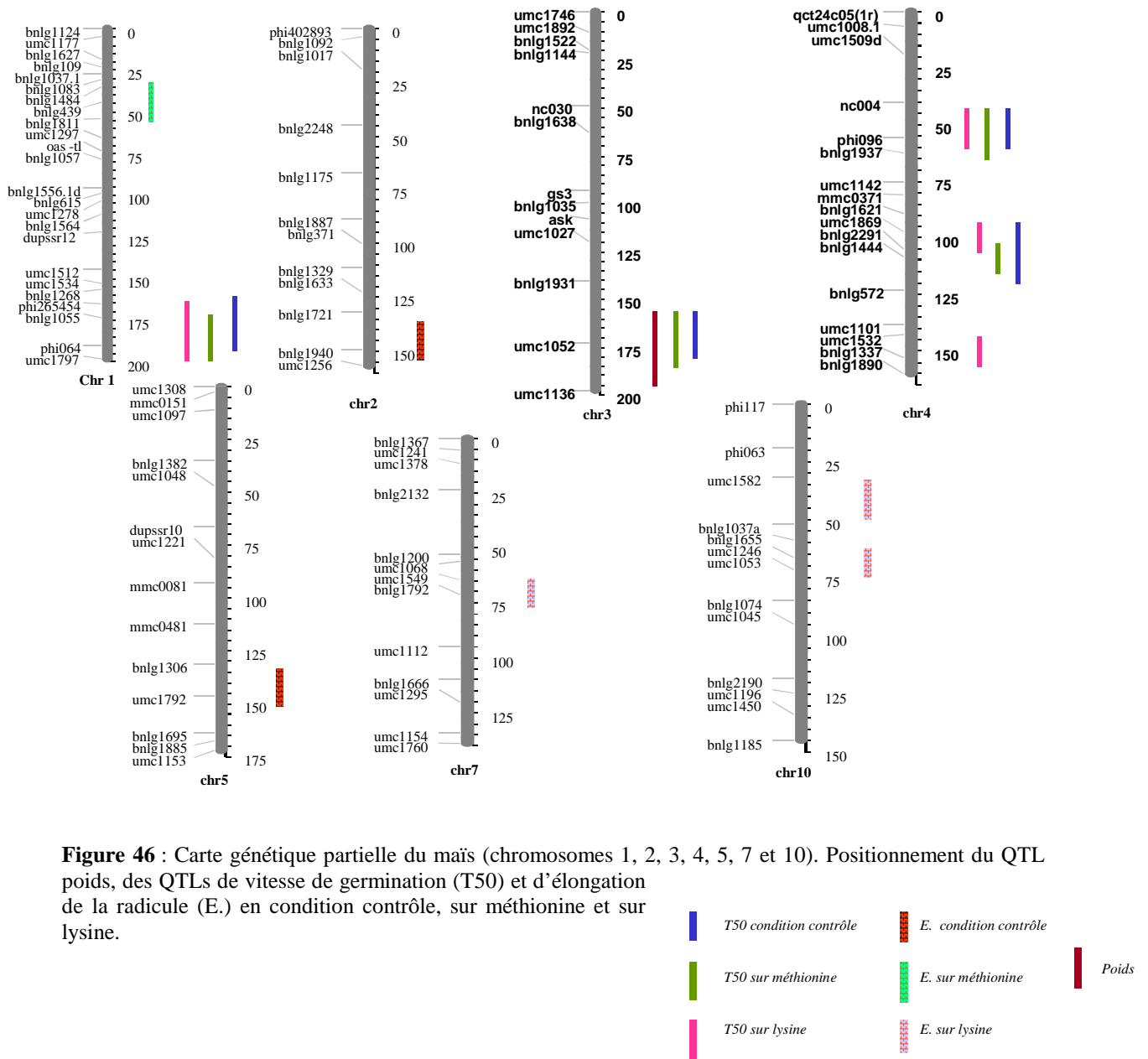
La différence de germination entre les lignées Io et F2 est accompagnée d'une différence du métabolisme de l'aspartate. Ceci serait dû à une accumulation de lysine chez la lignée à vitesse lente. Comme cela a été fait au cours de l'étude sur l'implication de la voie de l'aspartate sur la germination (chapitre I), l'effet de la lysine a été évalué sur les lignées parentales F2 et F334. La lignée F2 est commune aux deux expériences et correspond à une lignée à germination lente ; la lignée F334 est introduite au cours de cette nouvelle étude grâce à la collaboration avec l'UMR INRA/USTL 1281, stress abiotiques et différenciation des végétaux cultivés, Estrées – Mons et correspond à une lignée à germination rapide. Les lignées parentales sont mises à germer sur 5mM de méthionine, de thréonine et de lysine. La méthionine présente un effet plutôt neutre sur la vitesse de germination contrairement à la lysine qui la ralentit et à la thréonine qui l'accélère. L'effet des acides aminés est plus marqué sur la vitesse de germination de la lignée F334 à germination rapide que sur la lignée F2 à germination lente. Cette différence de l'effet des acides aminés en fonction des génotypes avait également été observée entre les lignées Io et F2.

L'expression des gènes d'aspartate kinases des lignées parentales a été caractérisée par qt-RT-PCR. L'expression des gènes des aspartate kinases est quantifiée comme marqueur du polymorphisme de la biosynthèse des acides aminés. La lignée F334 est comparée à la lignée Io à germination rapide déjà bien caractérisée (chapitre I). La vitesse de germination de F334 est très proche de celle de Io contrairement à celle de F2 ; en effet le T50 est de 54h et 52h pour F334 et Io respectivement et celui de F2 est de 74h. L'analyse de l'expression des gènes codant pour les aspartate kinases montre que l'expression d'*ask1* est relativement constante au cours de la germination, ceci chez les lignées F2, F334 et Io, alors que l'expression des gènes *ask2*, et *akh2* augmente au cours de la germination. Les résultats montrent également que l'expression de tous les gènes est plus importante chez les lignées Io et F334 à germination rapide que chez la lignée F2 à germination plus lente. (Wang et Larkins, 2001; Wang *et al.*, 2001) montrent qu'une différence d'expression des gènes d'aspartate kinase s'accompagne d'une différence

d'activité enzymatique et d'une différence de teneur en acides aminés essentiels. La similitude de l'expression des gènes des aspartate kinases entre la lignée F334 et la lignée Io suggère un flux plus important d'aspartate dans les branches méthionine/thréonine que dans la branche lysine chez la lignée F334 par rapport à la lignée F2, qui expliquerait la différence de vitesse de germination entre F334 et F2. La germination et la croissance de la racine de la lignée F334 ne serait pas soumise à un effet négatif d'une forte teneur physiologique en lysine, comme pourrait l'être la germination et la croissance de la racine de la lignée F2 (chapitre I).

Le clonage des différents gènes de l'aspartate kinase a été effectué dans le but de trouver du polymorphisme de séquence et de pouvoir les cartographier sur la carte génétique issue du croisement entre la lignée F2 et la lignée F334. L'objectif est de pouvoir mettre en évidence la liaison entre les gènes codant pour les aspartate kinases et la vitesse de germination. Seul le clonage de l'*ask2* a abouti et a mis en évidence au moins deux zones de polymorphisme (fig. n °41). Le clone issu de la lignée F2 présente 4 nucléotides en moins et 2 nucléotides différents du clone issu de la lignée F334. Ce polymorphisme a été utilisé pour génotyper les 125 lignées de BC2S5. Les résultats du génotypage ont permis de positionner l'*ask2* sur le chromosome 3. Cependant, le gène *ask2* a été positionné sur le chromosome 2 par (Muehlbauer *et al.*, 1994). Cette différence peut s'expliquer par l'existence d'autres gènes *sk2* non identifiés. Des travaux sur l'identification de gènes codant pour des aspartate kinases mono-fonctionnelles montrent l'existence de trois gènes (*ak-lys1*, *ak-lys2* et *ak-lys3*) chez *Arabidopsis thaliana* (Yoshioka *et al.*, 2001). Ces travaux montrent également qu'une mutation d'*ask-lys3* au niveau de la boîte aspartate kinase et du motif DPR, indispensable pour l'activité aspartate kinase, n'induit aucune différence au niveau de la croissance, du développement et de la fertilité ; ceci peut s'expliquer par la redondance des aspartate kinases. En effet soit l'*ak-lys3* s'exprime dans les mêmes régions que l'*ak-lys1* et l'*ak-lys2*, soit les acides aminés de la voie de l'aspartate sont transférés dans les zones où l'*ak-lys1* et l'*ak-lys2* sont exprimés. Il serait intéressant d'identifier, par Southern blot, l'ensemble des gènes codant pour les aspartate kinases mono-fonctionnelles et de les cartographier chez le maïs. L'existence d'un nombre important de gènes impliquerait une complexité accrue du contrôle spatial, temporel et génétique du métabolisme de l'aspartate dépendant en plus des génotypes.

L'expérience de germination a été réalisée en présence d'eau, de méthionine et de lysine. La distribution des caractères au sein de la population de 125 lignées issues du croisement F2xF334 est continue. Une distribution continue d'un caractère indique la présence de plusieurs facteurs génétiques auxquels s'ajoutent les effets du milieu qui influencent ce caractère. Il a donc été possible de rechercher les bases génétiques expliquant la vitesse de germination et d'élongation de la racine, en présence d'eau, de méthionine et de lysine, par une recherche de QTLs. Des QTLs de poids du grain ont également été recherchés comme élément supplémentaire pouvant servir à la discussion. Le nombre de QTLs détectés pour chaque condition est relativement faible, mais reste convenable étant donnée la population étudiée (taille de la population, distance phénotypique entre les parents, densité de marqueur). Seuls les QTLs à effet majeur ont donc été mis en évidence. Les autres QTLs, à effet mineur, ont besoin d'une population de plus grande taille et d'une carte génétique saturée par plus de marqueurs pour être détectés mais ils sont moins intéressants dans l'approche utilisée. Les résultats ont permis de détecter 4 QTLs (T50 condition contrôle), 4 QTLs (T50 sur méthionine) et 4 QTLs (T50 sur lysine) et 1 QTL de poids (fig. n°46). La comparaison des QTLs de germination montre que tous les QTL (T50 en condition contrôle) co-localisent systématiquement avec les QTLs (T50 sur méthionine). Ceci confirme l'hypothèse d'un effet neutre de la méthionine à 5mM sur la germination issue de l'observation de la germination des lignées parentales en présence de méthionine.



Dans le but de rechercher les gènes candidats expliquant la présence des QTLs, des zones de co-localisation de QTLs ont été définies. Ces zones sont caractérisées par la présence d'au moins deux QTLs (T50). La co-localisation de plusieurs QTLs du même

caractère dans des conditions différentes valide d'autant plus la détection et met en évidence les QTLs dits stables.

Au niveau de la **zone 1**, proche du marqueur *bnlg1055*, sont positionnés les QTLs T50 des 3 conditions. Cette co-localisation de QTLs (T50) valide la présence d'un gène ou d'un cluster de gènes impliqué dans le contrôle de la vitesse de germination. Les QTLs au niveau de cette zone ont des valeurs de LODs compris entre 2,06 et 2,46 ce qui signifie que la probabilité que ces QTLs aient été détectés par erreur est de 25 à 15%. Ils expliquent entre 6,4 et 8% de la variabilité phénotypique du caractère. Les résultats montrent que l'allèle provenant de la lignée F334 dans un fond génétique F2 induit une augmentation de la vitesse de germination de 9 à 11h en fonction des conditions. La présence d'acides aminés ne modifie pas de manière probante le bénéfice qu'apporte l'allèle F334. Dans cette zone, de nombreux gènes du métabolisme des sucres et des acides aminés ont été identifiés ; l'ADP-glucose-pyrophosphorylase, la glycogène phosphorylase, la sucrose synthase et la cellulose synthase pour le métabolisme des sucres ainsi que la glutamate décarboxylase pour le métabolisme des acides aminés ont été retenus comme candidats. L'hypothèse qu'un ou plusieurs de ces gènes soient impliqués dans le contrôle de la vitesse de germination est en accord avec les nombreux liens établis entre germination et métabolisme carboné et azoté. Au cours de la germination, de nombreux processus de mobilisation des réserves impliquant le métabolisme carboné sont mis en place. Ces processus peuvent influencer sur la capacité de certains génotypes à germer plus au moins vite en fonction, d'une part de la nature des réserves et d'autre part des mécanismes d'utilisation de ces réserves. Il est possible que l'ADP glucose pyrophosphorylase, enzyme clé et limitante de la synthèse de l'amidon, stimulée par certains produits de la photosynthèse comme le 3 phosphoglycérate (3PGA) et inhibé par le PPI (Wattebled *et al.*, 2005), induise une différence de teneur en amidon mais aussi une différence au niveau de la proportion amidon / glycogène / cellulose au cours de la formation des graines chez les lignées F2 et F334. L'amidon, le glycogène et la cellulose sont des polymères de glucose qui se différencient par la nature des liaisons entre les molécules de glucoses. L'amidon est constitué essentiellement de glucoses liés en γ 1-4 et très peu de ramification en γ 1-6, le glycogène est constitué de glucose liés en γ 1-4 et γ 1-6 et la cellulose est un polymère d'unités de glucose liées en β 1-4. La glycogène phosphorylase, également candidat pour expliquer la présence du QTL, libère plus facilement les molécules de glucose constituant les polymères, lorsque ces polymères possèdent des ramifications γ 1-6 (Hames *et al.*,

2000). La capacité à rendre disponible le glucose au cours de la germination peut expliquer la présence de la glycogène-phosphorylase au niveau du QTL. La sucrose synthase, également candidat, contrôle le flux de carbone entre la biosynthèse des polysaccharides et la respiration, mais aussi dans la génération de l'UDP-glucose, dans la sensibilité de la cellule au signal induit par les sucres, dans l'expression des gènes impliqués dans la formation des réserves ou la maturation des graines (Koch, 2004). Des travaux ont montré que la diminution significative de l'activité de la sucrose synthase induit l'inhibition du développement de l'embryon et de l'endosperme chez le coton (Zeng *et al.*, 1998). De plus, la transcription et la traduction ainsi que la localisation sub-cellulaire de la sucrose synthase sont régulées par des conditions physiologiques bien spécifiques. En effet, un déficit en oxygène induit une augmentation importante des ARNm et de l'activité enzymatique (Zeng *et al.*, 1998, 1999) et l'affinité de la sucrose synthase pour la membrane plasmique est régulée par le niveau de phosphorylation de l'enzyme (Koch, 2004). Une différence au niveau de l'expression ou de la régulation de la sucrose synthase chez les lignées F2 et F334 peut induire une différence au niveau de la gestion des sucres et donc une différence de vitesse de germination expliquant la présence du QTL. Une cellulose synthase impliquée dans la construction des parois cellulaires a aussi été localisée dans cette zone. Au cours de la germination la percée du tégument par la radicule est rendue possible grâce à l'allongement des cellules (Bewley, 1997). La cellulose synthase provenant de la lignée F334 pourrait être différente de celle de la lignée F2 et répondre plus rapidement au besoin en cellulose de la cellule. En somme, une différence au niveau des réserves mais aussi de la capacité à rendre disponible le glucose au cours de la germination ou de le mobiliser pour la synthèse des parois peut expliquer le lien entre la différence observée au niveau de la vitesse de germination des deux lignées et le cluster de gènes impliqués dans le métabolisme des sucres localisés au niveau des QTL de la zone 1.

Au cours de la germination, de nombreux processus de mobilisation des réserves impliquant le métabolisme azoté sont également mis en place. La glutamate décarboxylase peut être un bon candidat pour expliquer la présence de ce QTL. En effet, cette enzyme joue un rôle important dans le maintien du pH du cytosol et dans la synthèse d'alanine. La glutamate décarboxylase dégrade le glutamate pour former du GABA en consommant des H⁺ et le GABA formé est un intermédiaire de la synthèse d'alanine et de pyruvate. Le GABA joue un rôle dans le maintien de la balance C/N, dans la régulation du pH du cytosol, dans la protection contre les stress oxydatifs, dans le contrôle osmotique et la

transmission de signal (Bouche *et al.*, 2003). Entre les deux lignées, il pourrait exister un polymorphisme d'expression du gène codant pour la glutamate décarboxylase ou un polymorphisme au niveau de l'activité enzymatique liée au pool de glutamate ou au pool d'activateur ou inhibiteur de l'enzyme expliquant, par l'intermédiaire du GABA, la différence de germination.

Au niveau de la **zone 2**, proche du marqueur umc1052, est positionné le seul QTL de poids de cette étude. Il a été détecté avec un r^2 relativement faible, ce qui signifie que (i) dans les conditions de l'étude (taille de la population, distance phénotypique entre les parents, densité de marqueurs), les QTLs moins forts n'ont pas été détectés (ii) malgré une carte saturée certaines zones du génome restent inaccessibles (iii) le caractère poids, bien que possédant une base génétique, est très fortement influencé par l'environnement. De nombreuses études ont montré l'influence de l'ensoleillement, de la nutrition et de la température sur la taille, le poids et le rendement des grains (Austin *et al.*, 2000; Fryer *et al.*, 1998). Cet unique QTL de poids co-localise avec 2 autres QTLs correspondant à la vitesse de germination en conditions contrôles (T50 condition contrôle et T50 sur méthionine). Ces 2 QTLs expliquent entre 9,5 et 18,9 % de la variabilité phénotypique du caractère. L'analyse des effets de ces QTLs montre que l'allèle issu de la lignée F334 induit à la fois une augmentation de poids et une diminution de la vitesse de germination. La corrélation négative entre le poids et la vitesse de germination a également été mise en évidence dans l'étude de Limami *et al.* 2002. En effet, Io qui présente des graines de petites tailles et légères par rapport à la lignée F2 germe plus rapidement. La coïncidence de QTL de poids et de QTL de T50 dans deux études différentes suggère que le gène ou le cluster de gènes impliqué dans la variation du poids du grain est directement ou indirectement impliqué dans la vitesse de germination. Dans cette zone, une vingtaine de gènes est connue (Tableau n°VIIIb) ; certains sont impliqués dans le métabolisme carboné comme l'ADP-glucose-pyrophosphorylase et la malate-deshydrogénase et peuvent être candidats pour expliquer ce QTL.

Sur le chromosome 4, deux zones ont été mises en évidence ; la zone 3 proche du marqueur nc004 et la zone 4 proche du marqueur bnlg1444. Au niveau des zones 3 et 4, une co-localisation des 3 mêmes QTLs a été détectée : 1 QTL (T50 condition contrôle), 1 QTL (T50 sur méthionine) et 1 QTL (T50 sur lysine). Cette co-localisation de QTLs (T50)

valide la présence d'un gène ou d'un cluster de gènes impliqué dans le contrôle de la vitesse de germination. Ces deux zones 3 et 4 indiquent une base génétique commune entre la germination en présence d'eau, en présence de méthionine et en présence de lysine ; ces résultats sont en accord avec les corrélations obtenues entre ces caractères.

Les QTLs au niveau de la **zone 3** (tableau n°VIIIc) ont des valeurs élevées de LODs, de 4,34 pour le QTL (T50 sur lysine), de 4,30 pour le QTL (T50 sur méthionine) et de 2,29 pour le QTL (T50 en condition contrôle), ce qui signifie qu'il y a moins de 5% de probabilité que ces QTLs aient été détectés par erreur. Ils expliquent entre 10,5 et 14,6 % de la variabilité phénotypique du caractère. Le marqueur nc004 correspond au gène codant pour l'ADH2. La plus forte probabilité de trouver le gène qui explique un QTL se situe au niveau du pic de détection des QTLs (De Vienne et Causse, 1998) ce qui est vraie pour 2 sur 3 QTLs. De ce fait, le gène *adh2* codant pour l'alcool déshydrogénase (ADH) peut être considéré comme un bon candidat pour expliquer la vitesse de germination en présence d'eau, de méthionine et de lysine. L'ADH catalyse la réaction réversible de conversion de l'éthanol en acétaldéhyde en présence de NADH/NAD⁺. Il existe deux gènes codant pour l'ADH, *adh1* et *adh2*, à l'origine de trois isoenzymes : deux homodimères ADH1-ADH1 et ADH2-ADH2 et un hétérodimère ADH1-ADH2. L'expression des gènes et l'activité enzymatique de l'ADH évoluent en fonction de l'organe, du stade physiologique et des conditions de stress (Garvin *et al.*, 1994; Millar *et al.*, 1994). L'augmentation de l'ADH est essentielle au maintien de la glycolyse en condition de stress anoxique. Le rôle de l'ADH est de (i) réoxyder le NADH produit par la glycolyse, (ii) réguler l'accumulation d'acétaldéhyde, composé toxique, (iii) éviter la réoxydation du NADH par la lactate déshydrogénase et donc l'acidification du cytosol. Les résultats montrent que le QTL, et sans doute par conséquent l'*adh2*, de la lignée F334 dans un fond génétique F2 induit une augmentation de la vitesse de germination de 10 h et 11 h (QTL T50 en condition contrôle et QTL T50 sur méthionine respectivement) en conditions contrôles et de 19 h (QTL T50 sur lysine). (Touchard, 2006) montre que les QTLs taille de feuille, précocité et teneur en fructose identifiés également dans cette zone 3 du chromosome 4, répondent aux variations de température. Dans cette étude, qui utilise le même croisement, il apparaît que la lignée F334 accumule plus de fructose que la lignée F2 en condition de stress « froid », alors que l'inverse est observé en condition normale. Dans notre étude, en supposant que la lysine provoque un signal physiologique négatif au sein de la cellule, comme le froid, la différence observée au niveau de la valeur des effets pourrait s'expliquer par le fait que la

lignée F334 apporte un bénéfice plus important dans des conditions physiologiques négatives. L'allèle *adh2*, provenant de la lignée F334, serait plus performant dans les processus de tolérance au stress anoxique ou hypoxique et dans la régulation de la fermentation que l'*adh2* provenant de la lignée F2 au cours de la germination. Ceci appuie l'hypothèse que l'ADH serait un bon candidat, en permettant le maintien de la glycolyse même dans des conditions défavorables. Par ailleurs, l'importance de l'ADH au cours de la germination a été montrée par de nombreuses études. En effet, (Côme et Corbineau, 1998) ont réalisé des expériences sur l'effet de différents substrats de l'ADH sur la germination. Les résultats montrent que les substrats de l'ADH stimulent la germination en activant la glycolyse et le cycle de krebs. Une autre étude montre qu'en présence d'un inhibiteur de l'ADH, le 4-méthylpyrazole, l'éthanol ne stimule plus la germination, ni la consommation d'oxygène dans les semences d'avoine (Côme et Corbineau, 1998).

Les QTLs au niveau de la **zone 4** ont des valeurs de LODs compris entre 2,35 de 4,43 ce qui signifie qu'il y a moins de 15% de probabilité que ces QTLs aient été détectés par erreur. Ils expliquent entre 12,8 et 19,9 % de la variabilité phénotypique du caractère. Les résultats montrent que l'allèle provenant de la lignée F334 dans un fond génétique F2 induit une augmentation de la vitesse de germination de 11 h (QTL T50 en condition contrôle) de 17 h (QTL T50 sur méthionine) et de 19 h (QTL T50 sur lysine). Le bénéfice qu'apporte l'allèle F334 est plus important en présence des acides aminés et en particulier en présence de lysine. Au niveau de cette zone, de nombreux QTLs ont été identifiés dans d'autres études : des QTLs de biomasse de début de cycle et de floraison (Touchard, 2006), des QTLs (Fv/Fm à 25°C) d'efficacité du photosystème II (Fracheboud *et al.*, 2004), des QTLs d'activité glutamine synthétase (Limami *et al.*, 2002), de vitesse de germination (Hund *et al.*, 2004; Limami *et al.*, 2002) des QTLs (*qgrwt2* et *qgrwt5*) de poids de grain, des QTLs (*qdpoll3* et *qdpoll8*) de date de sortie du pollen (www.maizedb.org). Contrairement aux autres zones, celle-ci regroupe de nombreux QTLs impliqués dans le fonctionnement général de la plante, détectés indépendamment des conditions extérieures. La présence de la glutamine synthétase, localisée dans cette zone (tableau n°VIII d), peut justifier la détection du QTL d'activité GS et la liaison, déjà mentionnée au chapitre I, entre le métabolisme azoté et la germination (Glevarec *et al.*, 2004; Limami *et al.*, 1999; Limami *et al.*, 2002; Mifflin et Habash, 2002). Parallèlement, les gènes sucrose synthase, pyruvate déshydrogénase, impliqués dans le métabolisme carboné peuvent également

expliquer la présence des QTLs, qui laisseraient penser à la liaison entre réserves accumulées au cours de la formation de la graine et vitesse de germination.

Le **QTL (T50 sur lysine)**, positionné sur le chr 4 proche du marqueur *bnlg1337*, est le seul spécifique et donc susceptible de co-localiser avec un ou plusieurs gènes spécifiques du rôle inhibiteur de la lysine sur la germination. En effet, contrairement aux autres QTLs qui sont généralistes de la germination, celui-ci est bien spécifique à la germination en présence de lysine. Les courbes de germination montrent que la lignée F334 est plus sensible à l'effet inhibiteur de la lysine que la lignée F2 ; on pourrait s'attendre à ce que l'allèle provenant de la lignée F334 ait un effet négatif sur la germination. Pourtant, on observe que cet allèle induit une augmentation de la vitesse de 14 h ; ceci signifie que les lignées possédant l'allèle de F334 dans un fond F2 sont avantagées par rapport aux deux parents. En effet, ces lignées possèdent un fond génétique F2 moins sensible à la lysine et l'allèle F334 favorable à la vitesse de germination. En d'autres termes, la combinaison de l'allèle de F334 au niveau de ce QTL dans un fond génétique F2 permet de limiter l'effet inhibiteur de la lysine sur la vitesse de germination. Le métabolisme général de la lignée F2 habitué à de fortes teneurs en lysine, serait moins sensible à un apport extérieur de lysine mais fonctionnerait plus lentement que les lignées présentant de faibles teneurs en lysine. Par contre, la lignée F334 ayant une expression des gènes d'aspartate kinase très similaire à celle de la lignée Io, présenterait un flux de l'aspartate plus important dans les branches méthionine et thréonine que dans la branche lysine qui favoriserait la vitesse de germination. En résumé, la lignée F2 germe moins vite mais est moins sensible à l'apport extérieur en lysine alors que la lignée F334 germe plus rapidement mais est plus sensible à l'apport extérieur en lysine.

Dans cette zone, parmi les 14 gènes qui ont été localisés (tableau n°VIIIe), la cystathionine- β -lyase, les pyrophosphatases, les protéines liées à la calmoduline, les protéines kinases similaires à la protéine shaggy et l'invertase pourraient expliquer ce fonctionnement particulier, qui fait que la combinaison de l'allèle de F334 au niveau de ce QTL dans un fond F2 permet de limiter l'effet inhibiteur de la lysine sur la vitesse de germination. La cystathionine- β -lyase est une enzyme qui catalyse le clivage de la cystathionine en homosérine (qui permet la synthèse de méthionine), en pyruvate et en ammonium (Azevedo *et al.*, 2006). Des travaux de sur-expression et de sous-expression de la cystathionine- β -lyase chez la pomme de terre ont montré que l'accumulation des

intermédiaires de la voie de la méthionine joue un rôle important dans la croissance et le développement de la plante (Maimann *et al.*, 2000) rôle confirmé chez *Arabidopsis* (Hacham *et al.*, 2002). Dans les lignées possédant l'allèle F334, la cystathionine- β -lyase permettrait la formation de méthionine et par conséquent un développement et une vitesse de germination rapide (fig. n°47) dans un contexte où le métabolisme général est moins sensible à l'apport extérieur de lysine. Les pyrophosphatases, les protéines liées à la calmoduline et les protéines kinases similaires à la protéine shaggy sont des enzymes impliquées dans les voies de signalisation à travers des processus de phosphorylation/déphosphorylation ou d'activation/inhibition des protéines permettant la perception de l'état physiologique de la cellule. Les invertases ont un rôle important dans la distribution et l'utilisation des sucres, mais surtout dans la régulation par les sucres de certains gènes (ex : ABA) au niveau transcriptionnelle ou post transcriptionnelle (Chourey *et al.*, 2006; Koch, 2004). En présence de lysine, les allèles provenant de la lignée F334 permettraient sans doute une meilleure perception du signal et/ou une réponse plus efficace que ceux provenant de la lignée F2.

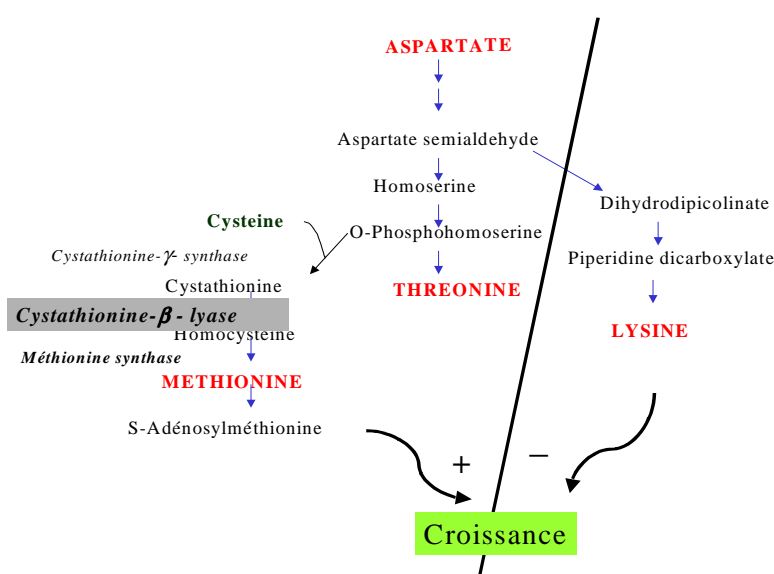


Figure 47 : Position de la cystathionine- β -lyase au sein de la voie de l'aspartate. L'influence des acides aminés issus de la voie de l'aspartate sur le développement est également présenté (*schéma hypothétique*).

Les résultats d'élongation de la racine en présence d'acides aminés, montrent que l'élongation de la racine est ralentie par rapport à l'élongation en présence d'eau. Les photos montrent un effet plus important des acides aminés chez la lignée F334 que chez la lignée F2. La diminution de l'élongation est plus marquée en présence de lysine ceci chez les deux lignées. L'élongation de la racine en présence de la thréonine et de la méthionine induit une variabilité de réponses entre les individus qui ne permet pas d'évaluer avec exactitude l'effet de ces deux acides aminés. Les résultats concernant l'élongation de la racine ont mis en évidence 2 QTLs (E. condition contrôle) 1 QTL (E. sur méthionine) et 3 QTLs (E. sur lysine). Les QTLs d'élongation de la racine ne co-localisent pas entre eux. Ces résultats sont en accord avec les coefficients de corrélation obtenus dans l'analyse des caractères pris deux à deux. Il n'y a aucun QTL (E.) commun aux trois conditions expérimentales (en présence d'eau, de méthionine ou de lysine). Les acides aminés au cours de l'élongation sont sans doute assimilés comme élément de nutrition et de ce fait, leur métabolisme différent induit une différence dans la croissance et le développement de la racine. Les QTLs détectés représentent de 9,4 à 12,5 % de la variation phénotypique. L'effet de l'allèle de F334 est assez faible en présence d'eau (0,004 mm/h pour le chr 2 et 0,005 mm/h pour le chr 5), un peu plus marqué en présence de méthionine (+0,41 mm/h pour le chr 1) et négatif en présence de lysine (-0,92 mm/h pour le chr 7, -0,96 et -0,82 mm/h pour le chr 10). Ces derniers résultats sont en accord avec l'effet de la lysine, moins marqué chez F2, et l'hypothèse que l'accumulation des acides aminés de la voie de l'aspartate chez la lignée F2 la rendrait moins sensible à la lysine. De ce fait les allèles favorables à l'élongation de la racine en présence de lysine proviennent de la lignée F2.

Les QTLs impliqués dans le contrôle de la vitesse de germination et de l'élongation de la racine sont différents. En effet, aucune co-localisation entre QTL (T50) et QTL (E.) n'a été détectée dans cette analyse. Ces résultats sont en accord avec les expériences de Hodges *et al.* (1997). qui montrent qu'au cours de deux stades de développement successifs, germination et stades précoces de la croissance, les phénomènes physiologiques de croissance sont contrôlés par des facteurs génétiques différents.

CONCLUSION

L'utilisation de l'expression des gènes AK comme marqueur de polymorphisme de la voie de l'aspartate et surtout de la vitesse de germination semble être confirmée dans ce chapitre. En effet, les résultats montrent que l'expression des gènes codant pour les AK, et en particulier l'expression du gène *akh2*, est plus importante chez les lignées Io et F334 (à germination rapide) que chez la lignée F2 (à germination plus lente). De plus, on observe une augmentation considérable de l'expression de ce gène après 52h d'imbibition chez les deux lignées à vitesse de germination rapide.

L'effet inhibiteur de la lysine sur la vitesse de germination a été montré pour les 128 lignées (Io, F2, F334 et la descendance de back-cross).

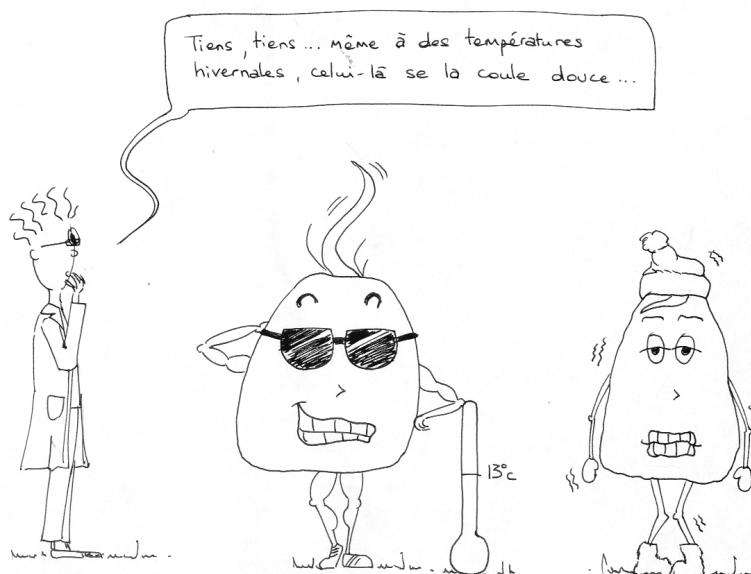
La recherche de QTLs impliqués dans l'effet de la lysine sur la germination a permis de détecter des QTLs généralistes de la germination, sur les chr 1, 3 et 4 et un QTL spécialiste de la germination en présence de lysine sur le chr 4. Les QTLs généralistes pourront être utilisés lors de projets visant à créer des génotypes à germination rapide comme cela a déjà été proposé chez la tomate (Foolad *et al.*, 1999).

L'intervalle des QTLs détectés est assez important ; il est nécessaire de le réduire afin de limiter le nombre de gènes candidats. Par ailleurs, la pertinence des gènes proposés mérite d'être vérifiée par l'analyse de l'expression de ces gènes (du gène à la protéine).

L'étude montre également que les QTLs impliqués dans le contrôle de la vitesse de germination sont différents de ceux impliqués dans le contrôle de l'élongation de la racine au cours des 124 premières heures, ceci en condition contrôle, en présence de méthionine ou de lysine.

Les résultats issus de ce chapitre ont fait l'objet d'un article dans la revue « ACTA Agronomica Hungarica » sur la cartographie et l'étude génétique de l'effet inhibiteur de la lysine sur l'élongation de la racine et l'établissement de la plantule (annexe n°4) et d'un article en cours de rédaction sur l'ensemble des QTLs T50 détectés.

**Chapitre III : Recherche de QTLs impliqués dans
la vitesse de germination du maïs (*Zea mays*) en
condition de basse température**



INTRODUCTION

La température est considérée comme l'un des facteurs écologiques les plus importants régissant la distribution des espèces et le rendement des récoltes. Beaucoup d'espèces sont cultivées dans des zones plus froides que leur zone d'origine et, par conséquent, leur rendement et leur croissance optimale sont contraints par des seuils thermiques. Un nombre important de travaux ont été réalisés afin d'identifier les mécanismes physiologiques impliqués dans la tolérance ou la résistance au froid (Borovskii *et al.*, 2002; Fryer *et al.*, 1998; Fryer *et al.*, 1995) ainsi que les QTLs de développement en condition de stress « froid » (Andaya et Mackill, 2003; Fracheboud *et al.*, 2004; Fracheboud *et al.*, 2002; Fujino *et al.*, 2004; Hund *et al.*, 2004; Jompuk *et al.*, 2005; Kreps *et al.*, 2002). Comparativement aux études menées durant la phase végétative très peu d'études ont été réalisées au cours de la germination et au stade levé de la jeune plante. Le maïs fait parti des espèces très sensibles au stress « froid » lors de la germination (Côme et Corbineau, 1998; Stamp, 1984). En effet, au cours de la germination, l'hydratation passive de la graine induit la reprise des activités enzymatiques qui implique une sensibilité accrue de la graine au froid. La germination est ralentie, voire inhibée, lorsque la température baisse. Une exposition prolongée à des températures comprises entre 0 et 12°C peut entraîner la mort de 30 à 50% des grains de maïs (Miedema, 1982). Il existe très peu d'études portant sur l'identification des mécanismes de perception, de tolérance et de réponse au froid ainsi que leurs bases génétiques au cours de la toute première phase du développement. Sachant que sans cette étape le reste du développement est compromis, il est intéressant de mettre en évidence les zones du génome impliquées dans la tolérance au froid, voire les mécanismes que ces zones contrôlent.

L'objectif de ce chapitre est de détecter les zones du génome impliquées dans la vitesse de germination et en particulier les zones impliquées dans la réponse au stress « froid » par analyse QTLs. L'étude est réalisée sur une population de back-cross avancé issu du croisement entre les lignées F2 et F334. Contrairement à la lignée F2, la lignée F334 est caractérisée par sa capacité à germer à basse température (10°C). Il est possible d'utiliser cette différence de réponse aux basses températures pour identifier les QTLs de la vitesse de germination en condition de basses températures. Les deux lignées

proviennent de régions possédant des caractéristiques climatiques très différentes ; de ce fait, les mécanismes mis en place lors du développement, en condition de basse température sont supposés différents (Eagles et Lothrop, 1994). L'analyse QTL permettra d'identifier les allèles provenant de la lignée F334 qui apportent un bénéfice dans un fond génétique F2 au cours de la germination dans des conditions de basses températures. Les résultats obtenus pourront également servir à l'identification des gènes responsables de la présence des QTLs, mais aussi à comprendre les mécanismes qui diffèrent entre F2 et F334 impliqués dans la différence de tolérance au froid.

RESULTATS

Les basses températures ralentissent, voire inhibent la germination en fonction des génotypes. Mener l'expérience à 13°C et à 20°C a pour but de mettre en évidence les zones du génome impliquées dans la tolérance ou la réponse aux basses températures provenant de la lignée F334. Réaliser l'expérience à 13°C permet de contraindre la germination du maïs à un stress « froid » ; en effet, l'optimum de température chez le maïs est de 30°C. La population de back-cross avancé, issue du croisement entre F2 et F334, est la même que celle utilisée lors de la recherche de QTLs T50 au chapitre II. Contrairement à la lignée F2, la lignée F334 est caractérisée par sa capacité à germer à basse température (10°C).

1- Germination en condition de basse température

Les graines des 125 lignées de BC2S5 ont été mises à germer sur 5ml d'eau dans des boîtes de Petri dans des chambres de culture à 20°C et 13°C. La moyenne des T50 relevés pour l'ensemble des lignées est de 121,41h (+/- 20,68) à 20°C et de 242,63h (+/- 40,83) à 13°C. La distribution des caractères « T50 à 20°C » et « T50 à 13°C » suit une loi normale (fig. n°48). La dispersion des caractères s'étend de 70 à 170h pour le « T50 à 20°C » et de 130 à 340h pour le « T50 à 13°C ». On peut constater un très fort éclatement de la distribution du caractère à 13°C. La vitesse de germination à basse température est corrélée à 58% avec la vitesse de germination à 20°C et à 17% avec le poids de mille grains.

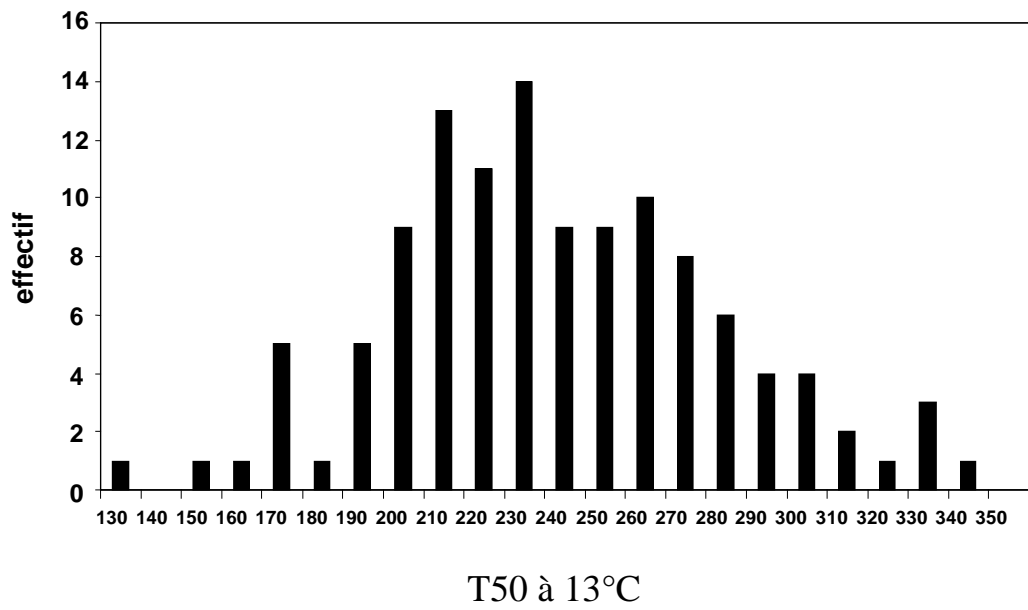
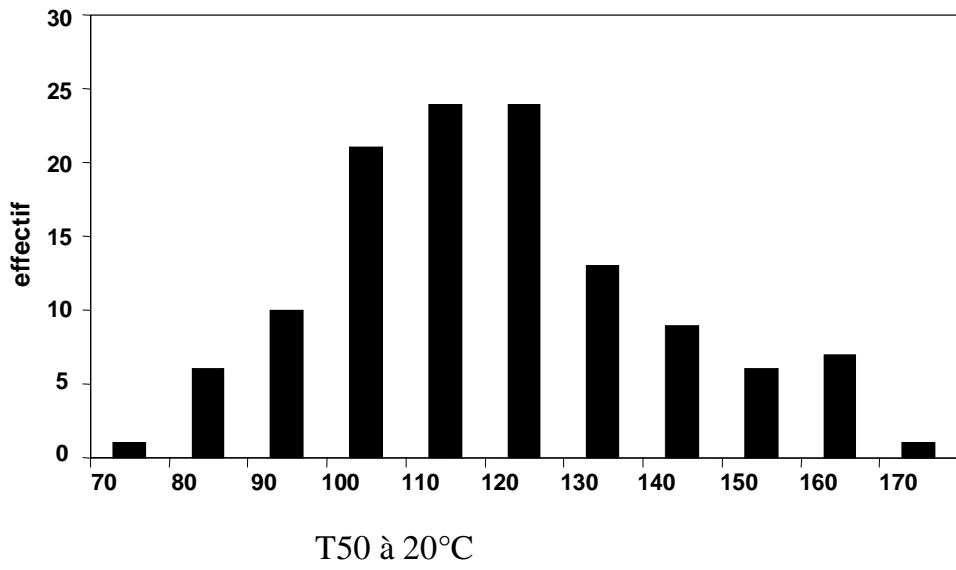


Figure 48 : Distribution des caractères au sein de la population

2- QTLs de vitesse de germination à 13°C

La détection de QTL a été réalisée en collaboration avec l'UMR INRA/USTL 1281, stress abiotiques et différenciation des végétaux cultivés, Estrées – Mons, France. La germination à 20°C correspond à la condition « contrôle » des expériences de germination réalisées au cours du chapitre II. Les zones impliquées dans le contrôle du caractère « T50 à 20°C » ont été détectées sur les chr 1, 2 et 4 (tableau n°VI).

Les zones impliquées dans le contrôle du caractère « T50 à 13°C » ont été détectées sur le chr 4 (tableau n°IX). Les QTLs ont été positionnés à 110 cM, proche du marqueur bnlg1444 et à 152 cM, proche du marqueur bnlg1337 ; ils expliquent respectivement 14 et 12% de la variabilité phénotypique. L'analyse de l'effet des allèles permet de mettre en évidence que les allèles de F334 des QTLs localisés sur le chr 4 confèrent une variation de -19h et -14h dans un fond génétique F2.

Tableau IX : QTLs putatifs

Caractère	chr	localisation		Intervalle de confiance	LOD	Effet (h)	R ² %
		Marqueur	distance cM				
T50 à 13 °C	4	bnlg1444	110	102-118	2,46	- 19	14,5
	4	bnlg1337	152	140-158	2,01	- 14	12,0

DISCUSSION

Les 125 lignées BC2S5 issues du croisement entre deux parents F334 et F2 sont mises à germer à 13°C et à 20°C. Les vitesses de germination (T50) obtenues ont montré qu'une température de 13°C ralentit considérablement la vitesse de germination de la majorité des lignées par rapport à une température de 20°C. De plus, on observe un fort éclatement de la distribution du caractère qui laisse supposer la présence de plusieurs loci impliqués dans le contrôle du caractère. En effet le nombre de loci qui contrôle un caractère peut être lié au nombre de classes dans la distribution du caractère (De Vienne et Causse, 1998). Par ailleurs, une corrélation de 58% entre la germination à 13°C et la germination à 20°C a été évaluée, ce qui signifie qu'il existe des phénomènes communs impliqués dans le contrôle du caractère dans ces deux conditions. L'identification des phénomènes communs permettra d'avoir une indication sur les bases génétiques qui régissent la germination indépendamment des conditions extérieures de température. Parallèlement, les phénomènes non communs, mis en place de manière spécifique en réponse aux basses températures, permettront d'avoir des données sur les bases génétiques contrôlant la différence de tolérance au froid entre deux génotypes. Les zones du génome impliquées dans le contrôle de la germination en condition normale et en condition de basse température ont été identifiées par analyse QTLs. Les résultats ont mis en évidence 4 QTLs de germination en condition contrôle sur les chromosomes 1, 3 et 4 ; et 2 QTLs de germination à basse température sur le chromosome 4 (fig. n°49).

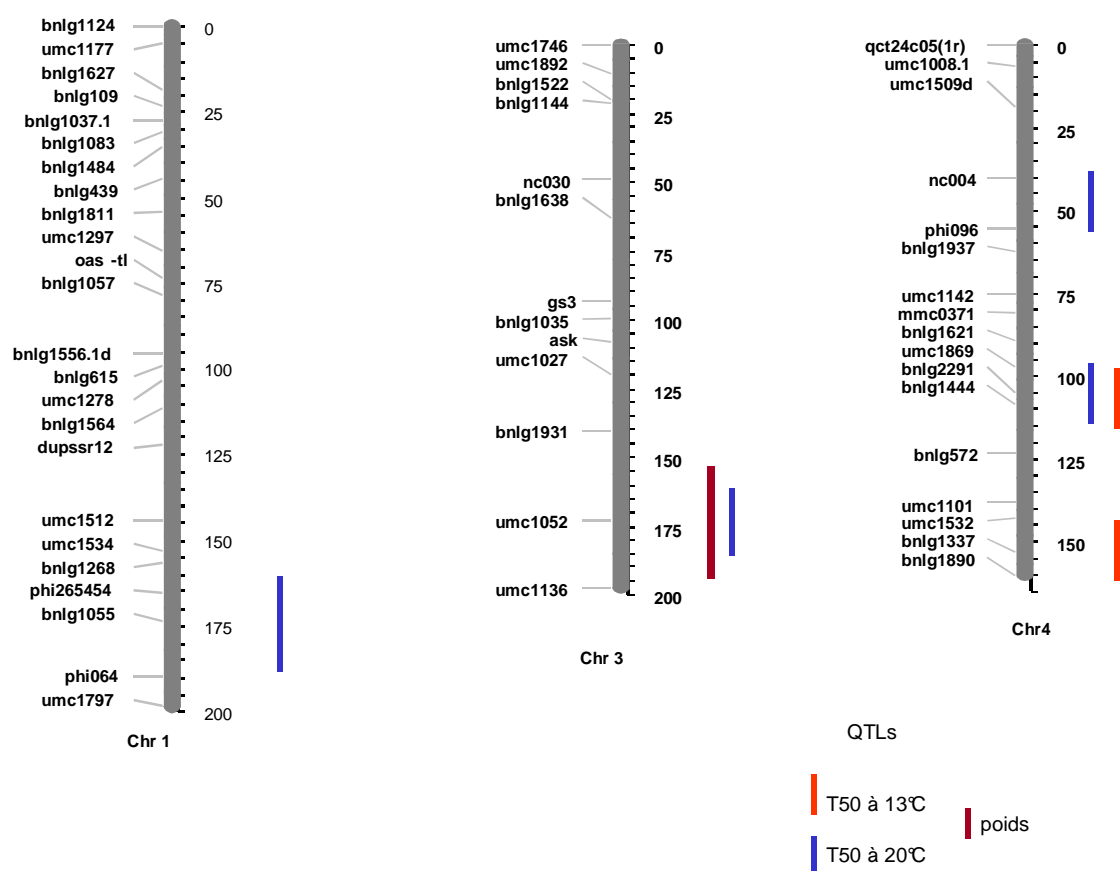


Figure 49 : Carte génétique partielle du maïs (chromosomes 1, 2 et 4) et positionnement des QTLs de vitesse de germination (T50) à 20°C et à 13°C et du QTL poids.

Le premier QTL (T50 à 13°C), proche du marqueur *bnlg1444*, co-localise avec un QTL (T50 à 20°C). Les intervalles des QTLs se chevauchent mais les deux pics de la valeur des LODs sont distants de 10 cM. Cette différence de 10 cM peut être expliquée par (i) la faiblesse de la détection (ii) la présence de deux QTLs distincts (iii) l'effet d'un autre QTL proche qui dévie la détection du premier. En absence de précision, deux hypothèses sont possibles. La première hypothèse est que le QTL (T50 à 13°C) est identique au QTL (T50 à 20°C). Ceci signifie que les gènes ou les clusters de gènes situés sont impliqués dans la vitesse de germination indépendamment de la température. Par contre l'effet de ces QTLs détectés à 20°C et à 13°C ne sont pas similaires : +11h à 20°C et +19h à 13°C. Les

conditions environnementales peuvent influencer sur les effets des QTLs (De Vienne et Causse, 1998), qui s'expliquent dans cette situation par un bénéfice plus important de l'allèle F334 en condition défavorable. La deuxième hypothèse est que le QTL (T50 à 13°C) est différent du QTL (T50 à 20°C). Ceci signifie qu'il n'y pas de base commune entre la vitesse de germination à 20°C et la vitesse de germination à 13°C.

Ce QTL (T50 à 13°C) co-localise avec les QTLs de la zone 4 définie au chapitre II. Au niveau de cette zone, de nombreux QTLs ont été identifiés au cours d'autres études : des QTLs de biomasse de début de cycle et de floraison (Touchard, 2006), des QTLs (Fv/Fm à 25°C) d'efficacité du photosystème II (Fracheboud *et al.*, 2004), des QTLs d'activité GS (Limami *et al.*, 2002), des QTLs de vitesse de germination (Hund *et al.*, 2004; Limami *et al.*, 2002) et en présence d'acides aminés (chapitre II), des QTLs (qgrwt2 et qgrwt5) de poids de grain, des QTLs (qdpoll3 et qdpoll8) de date de sortie du pollen (www.maizedb.org). Contrairement aux autres zones, cette zone regroupe de nombreux QTLs impliqués dans le fonctionnement général de la plante, détectés indépendamment des conditions extérieures. Les gènes glutamine synthétase, sucrose synthase et pyruvate déshydrogénase déjà cités au chapitre II restent candidat pour expliquer la présence de ce QTL. Leurs présences suggèrent une relation directe ou indirecte entre le métabolisme carboné et/ou azoté et la vitesse de germination.

Le deuxième QTL (T50 à 13°C), proche du marqueur bnlg1337, est spécifique à la condition défavorable de basse température. L'allèle issu de la lignée F334 induit une diminution du T50 de 14h, ce qui signifie que la germination est plus rapide lorsqu'une lignée possède l'allèle de F334 dans un fond génétique F2. Cette zone a également été mise en évidence dans des expériences de levée au champ en condition de basse température (*Giauffret communication personnelle*). Il est intéressant de retrouver les mêmes zones en condition contrôlée et en condition au champ. Cette coïncidence valide d'autant plus le QTL et indique que le gène ou le cluster de gènes qui explique ce QTL est impliqué dans la tolérance au froid au cours de la germination de la graine et au stade 5 feuilles de la plantule (*Giauffret communication personnelle*). Les mécanismes mis en place pour la tolérance au froid identifiés ne sont pas toujours identiques au cours du développement (Hodges *et al.*, 1997). Ce QTL co-localise également avec un QTL (T50 sur lysine) (chapitre II). L'effet de ce QTL est de + 19h dans les deux conditions (à 13°C et sur

lysine). Le bénéfice qu'apporte l'allèle F334 est donc identique dans ces deux conditions qui, rappelons le, ralentissent la germination.

L'intérêt de ce QTL est donc important car, non seulement il est spécifique à la germination en condition de basse température, mais il explique la tolérance au froid lors de la germination en condition contrôlée et au stade 5 feuilles au champ. La co-localisation du QTL (T50 13°C) avec le QTL spécifique (T50 sur lysine) laisse supposer que c'est une zone impliquée dans la germination en condition défavorable. De ce fait, les gènes proposés comme candidats susceptibles d'expliquer la présence du QTL (T50 sur lysine) (chapitre II) peuvent également être candidats pour expliquer le QTL (T50 à 13°C).

CONCLUSION

Cette étude a permis de détecter un QTL généraliste de la germination sur le chromosome 4 proche du marqueur bnlg1444 et un QTL spécifique de la germination en condition de stress « froid » sur le chromosome 4 proche du marqueur bnlg1337. La comparaison des résultats du chapitre II et III montre que ce QTL (T50 à 13°C) spécifique est sans doute un QTL de la germination en condition défavorable car il a également été détecté en présence de lysine. L'effet de cet allèle est plus important dans les conditions qui ralentissent la germination que dans les conditions normales. En conclusion, la lignée F334 est une source d'allèles favorables à la vitesse de germination en particulier lorsque la germination a lieu dans des conditions défavorables. Les résultats ont mis en évidence la zone du génome de F334 qui induit la capacité de F334 à germer plus vite à basses températures que la lignée F2, indépendamment des zones générales impliquées dans la vitesse de germination. Grâce aux caractéristiques de la population de back-cross utilisée, il sera rapidement possible d'intégrer des zones provenant de la lignée F334 identifiées par l'analyse QTL et d'obtenir des lignées quasi-isogéniques (NILs). L'intérêt ici est d'une part, de pouvoir cartographier avec précision les QTLs (par conséquent de limiter le nombre de gènes candidats) et d'autre part, d'apporter des indications nécessaires à la sélection et l'amélioration des génotypes.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES
GENERALES

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES GENERALES

Grâce à des approches interdisciplinaires de biochimie, de physiologie génétique et de génétique quantitative, ce travail a recherché des bases génétiques et des caractéristiques moléculaires qui permettent à une lignée de maïs (*Zea mays*) de germer plus vite qu'une autre, ceci dans des conditions normales ou défavorables.

Les résultats obtenus ont montré que le métabolisme des acides aminés est fortement lié à la vitesse de germination et à la croissance post-germinative. Le turn-over des acides aminés est différent en fonction des génotypes au cours de la germination, en particulier au niveau de l'embryon.

Dans une étude antérieure, 3 QTLs (T50) ont été mis en évidence (Limami *et al.*, 2002). Trois gènes *ask2*, *akh2* et *akh1* codant pour des enzymes clés de la voie de l'aspartate co-localisent avec ces QTLs (T50). Chez le maïs quatre gènes de cette famille ont été identifiés (l'*ask2* et l'*akh2* sur le chr 2, l'*akh1* sur le chr 4 et l'*ask1* sur le chr 7) (Muehlbauer *et al.*, 1994). Pourtant, lors de l'étude portant sur la cartographie de l'*ask2* sur la carte génétique, nous avons identifié un *ask2* sur le chr 3. L'identification récente d'un troisième gène *ask* chez *Arabidopsis* (Yoshioka *et al.*, 2001) laisse supposer que l'ensemble des gènes *ask* et *akh* n'ont pas encore été identifiés chez le maïs. La première étape qui peut être envisagée est d'effectuer des analyses par Southern blot pour identifier tous les gènes codant les aspartate kinases, puis de les cloner chez plusieurs lignées afin d'identifier les mécanismes de régulation de l'expression de gènes qui seraient liés au contrôle de la vitesse de germination.

L'un des résultats marquant de ce travail est d'avoir montré qu'*akh2* est le gène qui diffère le plus entre les lignées à germination rapide (Io et F334) et la lignée à germination

lente (F2). L'analyse de l'expression des gènes montre une augmentation considérable des transcrits du gène *akh2* après 52h d'imbibition chez les deux lignées à vitesse de germination rapide. Il serait intéressant de vérifier sur un ensemble de lignées s'il est possible d'utiliser cette augmentation comme marqueur de la vitesse de germination. Pour cela, il peut être envisagé de faire une étude de l'expression du gène à deux temps de la germination (ex : 24h et 52h) chez un nombre important de lignées de maïs et de comparer le niveau d'expression entre ces deux temps avec les T50 de chaque lignée.

Au cours de la germination, les acides aminés sont issus majoritairement de l'hydrolyse des protéines de réserve. Cependant, les résultats obtenus lors de l'étude de la voie de l'aspartate par suivi isotopique, suggèrent que les biosynthèses *de novo* d'acides aminés tiennent une place importante dans les différences de vitesse de germination observées entre les lignées. Les résultats obtenus lors de l'ensemble des travaux suggèrent que la vitesse de germination chez le maïs serait fortement liée à l'évolution de la lysine au cours de la germination. Trois résultats marquants vont dans ce sens :

- *Akh2*, qui diffère le plus entre les génotypes à germination rapide et le génotype à germination lente, code pour l'enzyme aspartate kinase bi-fonctionnelle qui court-circuite la voie de la lysine. Les lignées, qui présentent une plus forte augmentation de l'expression d'*akh2* au cours de la germination, germent plus vite.
- L'étude de la voie de l'aspartate par suivi isotopique montre que la synthèse *de novo* de lysine peut être liée à la vitesse de germination. Cette expérience a montré que l'aspartate est dégradé en méthionine et thréonine chez la lignée à germination rapide et en lysine chez la lignée à germination lente.
- Les expériences de germination en présence d'apport extérieur de lysine ont montré que cet acide aminé présente un effet négatif sur la vitesse de germination. Ceci conforte l'hypothèse d'un rôle négatif de la lysine sur le développement des plantes déjà mentionné dans d'autres études à d'autres stade de développement (Ben-Tzvi Tzchori *et al.*, 1996; Zhu et Galili, 2004).

Ces travaux méritent d'être approfondis. Il serait intéressant de déterminer les voies de régulation de l'expression des gènes aspartate kinases, en particulier de l'*akh2*, afin de définir à quel niveau intervient la différence entre les lignées à germination rapide et les lignées à germination lente. De plus, l'étude pourrait être complétée en déterminant l'importance de chaque acide aminé, en particulier la lysine, dans le contrôle de la vitesse de germination et de la croissance post-germinative du maïs. Pour cela, il peut être envisagé des expériences de génétique quantitative afin de lier la proportion de chaque acide aminé et la vitesse de germination. Autrement dit, il s'agit de vérifier si des QTLs de teneur en lysine et des autres acides aminés co-localisent avec des QTLs de vitesse de germination. Cette stratégie pourrait permettre à court terme de distinguer le rôle plus ou moins important de chaque acide aminé. A long terme, une stratégie par obtention de plantes transgéniques affectées dans l'expression de gènes codant pour des enzymes impliquées dans des voies de biosynthèse d'acides aminés pourrait être envisagée, afin de valider l'importance de ces dernières au cours de la germination et de la croissance post-germinative.

L'analyse de génétique quantitative a permis de localiser 4 QTLs (T50 en condition contrôle), 4 QTLs (T50 sur méthionine), 4 QTLs (T50 sur lysine), 2 QTLs (T50 à 13°C), 2 QTLs (E. en condition contrôle), 1 QTL (E. sur méthionine) et 3 QTLs (E. sur lysine).

Deux QTLs sont particulièrement intéressants : l'un est commun à toutes les conditions étudiées (chr 4, bnlg2291) et l'autre est commun à la germination en condition de stress « froid » et en présence de lysine (chr 4, bnlg1337). Concernant le premier QTL, l'allèle de F334 dans un fond génétique F2, indépendamment des conditions extérieures, induit une augmentation de la vitesse de germination. Ce QTL co-localise également avec de nombreux QTLs détectés au cours d'autres études (Fracheboud *et al.*, 2004; Limami *et al.*, 2002; Touchard, 2006). Il semblerait que cette zone du chromosome 4 chez le maïs soit importante, quel que soit le génotype. Elle peut donc être intéressante à utiliser dans les programmes de sélection et d'amélioration.

Le second QTL intéressant, localisé sur le chr4 proche du marqueur bnlg1337, correspond à une co-localisation d'un QTL (T50 sur lysine) et d'un QTL (T50 à 13°C). En présence de lysine et en condition de stress « froid », la germination est ralentie sur

l'ensemble des 125 lignées et la distribution du caractère est beaucoup plus éclatée qu'en condition contrôle. Un QTL commun aux deux conditions peut être dû à la mise en place d'un certain nombre de régulations géniques identiques lors d'un développement en condition défavorable, quelle que soit la nature de la condition. Deux hypothèses peuvent être proposées. La première est qu'une forte teneur en lysine dans le métabolisme induit un effet physiologique négatif tout comme la température ; cet excès de lysine dans la cellule provoquerait un stress. Cette première hypothèse serait en accord avec les phénomènes de cross tolérance, qui proposent qu'une voie de signalisation est commune à des stress différents (Pastori et Foyer, 2002). Le QTL commun correspondrait à des gènes impliqués dans une voie commune qui, à la fois perçoit ou répond au stress de la température et au stress provoqué par l'apport extérieur de lysine. La deuxième hypothèse est que la lysine est une molécule signal (Zhu et Galili, 2003). Par conséquent, cette hypothèse laisse supposer que la perception ou la réponse au stress froid passe par la lysine en tant que molécule signal.

Il serait intéressant de vérifier la pertinence des gènes candidats (la cystathionine- β -lyase, la pyrophosphatase, la protéine liée à la calmoduline, la protéine kinase similaire à la protéine shaggy et l'invertase). Afin d'approfondir l'hypothèse sur le rôle possible de la lysine, une approche utilisant les microarrays peut être développée. L'analyse par microarrays permet de mettre en évidence simultanément des différences d'expression de nombreux gènes entre deux conditions. Une expérience au cours de la germination en présence et en absence de lysine parallèlement à une expérience en condition de stress « froid » nous informera sur les gènes induits ou inhibés par la lysine ou le froid. L'analyse QTL a montré une base génétique commune à la germination en présence de lysine et en condition de « stress froid » (chr 4, bnlg1337), mais nous ne savons pas de quelle manière cette zone est impliquée. Plusieurs scénarii sont possibles :

- Le gène subit une régulation différente et donc il est plus ou moins exprimé.
- La protéine produite est mutée au niveau du site de régulation, d'adressage, d'activité, d'affinité pour les substrats...
- Le pool final de protéines est différent

Dans l'optique de confirmer l'hypothèse selon laquelle ce QTL est spécifique à la germination en condition défavorable, il serait intéressant de renouveler la détection de QTLs dans d'autres conditions défavorables à la germination.

Références Bibliographiques

Références Bibliographiques

- Aarnes H and Rognes S (1974). Threonine-sensitive aspartate kinase and homoserine dehydrogenase from *Pisum sativum*. *Phytochemistry* **13**, 2717-2724.
- Andaya VC and Mackill DJ (2003). Mapping of QTLs associated with cold tolerance during the vegetative stage in rice. *Journal of experimental botany* **54**, 2579-2585.
- Austin DF, Lee M, Veldboom LR and Hallauer AR (2000). Genetic Mapping in Maize with Hybrid Progeny Across Testers and Generations: Grain Yield and Grain Moisture. *Crop Science* **40**, 30-39.
- Azevedo R, Blackwell R, Smith R and Lea P (1992a). Tree aspartate kinase isoenzymes from maize. *phytochemistry* **31**, 3725-3731.
- Azevedo RA, Lancien M and Lea PJ (2006). The aspartic acid metabolic pathway, an exciting and essential pathway in plants. *Amino Acids* **30**, 143-62.
- Azevedo RA and Lea PJ (2001). Lysine metabolism in higher plants. *Amino Acids* **20**, 261-79.
- Azevedo RA, Smith RJ and Lea PJ (1992b). Aspartate kinase regulation in maize: evidence for co-purification of threonine-sensitive aspartate kinase and homoserine dehydrogenase. *Phytochemistry* **31**, 3731-3734.
- Bartlem D, Lambein I, Okamoto T, Itaya A, Uda Y, Kijima F, Tamaki Y, Nambara E and Naito S (2000). Mutation in the threonine synthase gene results in an over-accumulation of soluble methionine in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **123**, 101-10.
- Ben-Tzvi Tzchori I, Perl A and Galili G (1996). Lysine and threonine metabolism are subject to complex patterns of regulation in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology* **32**, 727-734.
- Bewley J (1997). Seed germination and dormancy. *Plant cell* **9**, 1055-1066.
- Bewley J and Black M (1994). Seeds: Physiology of development and germination. pp. 147-198. Plenum Press, New York and London.
- Borovskii GB, Stupnikova IV, Antipina AI, Vladimirova SV and Voinikov VK (2002). Accumulation of dehydrin-like proteins in the mitochondria of cereals in response to cold, freezing, drought and ABA treatment. *BioMedCentral Plant Biology* **2**, 5.
- Bouche N and Fromm H (2004). GABA in plants: just a metabolite? *Trends Plant Sciences* **9**, 110-5.
- Bouche N, Lacombe B and Fromm H (2003). GABA signaling: a conserved and ubiquitous mechanism. *Trends in cell biology* **13**, 607-10.
- Cattoir – Reynaerts A, Degryse E, Negritiu I and Javobs M (1981). Effects of aspartate – derived amino acids on growth of barley and *Arabidopsis thaliana* plants and callus. *Z. Pflanzphysiol* **1001**, 67 – 74.
- Chourey PS, Jain M, Li QB and Carlson SJ (2006). Genetic control of cell wall invertases in developing endosperm of maize. *Planta* **223**, 159-67.
- Churchill GA and Doerge RW (1994). Empirical threshold values for quantitative trait mapping. *Genetics* **138**, 963-71.
- Côme D and Corbineau F (1998). Semences et germination. In "Croissance et développement. Physiologie végétale II", pp. 185-313. Hermann, Paris.
- Cren M and Hirel B (1999). Glutamine synthetase in higher plants: regulation of gene and protein expression from the organ to the cell. *Plant Cell Physiology* **40**, 1187-1193.

- De Vienne D and Causse M (1998). "Les marqueurs moléculaires en génétique et biotechnologies végétales," INRA éditions, Nancy.
- Doebley J, Stec A and Hubbard L (1997). The evolution of apical dominance in maize. *Nature* **386**, 485-8.
- Dotson B, Somers DA. and Gengenbach BG. (1989). Purification and characterization of lysine-sensitive aspartate kinase from maize cell cultures. *Plant Physiology* **91**, 1602-1608.
- Eagles HA and Lothrop JE (1994). Highland maize from central Mexico its origin, characteristics, and use in breeding programs. *Crop Science* **34**, 11-19.
- Falque M, Decousset L, Dervins D, Jacob A-M, Joets J, Martinant J-P, Raffoux X, Ribiere N, Ridet C, Samson D, Charcosset A and Murigneux A (2005). Linkage Mapping of 1454 New Maize Candidate Gene Loci. *Genetics* **170**, 1957-1966.
- Ferrario-Mery S, Hodges M, Hirel B and Foyer CH (2002). Photorespiration-dependent increases in phospho enolpyruvate carboxylase, isocitrate dehydrogenase and glutamate dehydrogenase in transformed tobacco plants deficient in ferredoxin-dependent glutamine-alpha-ketoglutarate aminotransferase. *Planta* **214**, 877-86.
- Foolad MR, Lin GY and Chen FQ (1999). Comparison of QTLs for seed germination under non-stress, cold stress and salt stress in tomato. *Plant Breeding* **118**, 167-173.
- Fracheboud Y, Jompuk C, Ribaut JM, Stamp P and Leipner J (2004). Genetic analysis of cold-tolerance of photosynthesis in maize. *Plant Molecular Biology* **56**, 241-53.
- Fracheboud Y, Ribaut JM, Vargas M, Messmer R and Stamp P (2002). Identification of quantitative trait loci for cold-tolerance of photosynthesis in maize (*Zea mays* L.). *Journal of experimental botany* **53**, 1967-77.
- Frary A, Nesbitt TC, Grandillo S, Knaap E, Cong B, Liu J, Meller J, Elber R, Alpert KB and Tanksley SD (2000). fw2.2: a quantitative trait locus key to the evolution of tomato fruit size. *Science* **289**, 85-8.
- Fridman E, Pleban T and Zamir D (2000). A recombination hotspot delimits a wild-species quantitative trait locus for tomato sugar content to 484 bp within an invertase gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **97**, 4718-23.
- Fryer MJ, Andrews JR, Oxborough K, Blowers DA and Baker NR (1998). Relationship between CO₂ Assimilation, Photosynthetic Electron Transport, and Active O₂ Metabolism in Leaves of Maize in the Field during Periods of Low Temperature. *Plant Physiology* **116**, 571-80.
- Fryer MJ, Oxborough K, Martin B, Ort DR and Baker NR (1995). Factors Associated with Depression of Photosynthetic Quantum Efficiency in Maize at Low Growth Temperature. *Plant Physiology* **108**, 761-767.
- Fujino K, Sekiguchi H, Sato T, Kiuchi H, Nonoue Y, Takeuchi Y, Ando T, Lin SY and Yano M (2004). Mapping of quantitative trait loci controlling low-temperature germinability in rice (*Oryza sativa* L.). *Theoretical and applied genetics* **108**, 794-9.
- Galili G (1995). Regulation of Lysine and Threonine Synthesis. *Plant Cell* **7**, 899-906.
- Gallardo K, Job C, Groot SP, Puype M, Demol H, Vandekerckhove J and Job D (2002). Importance of methionine biosynthesis for Arabidopsis seed germination and seedling growth. *Physiologia plantarum* **116**, 238-247.
- Garvin D, Weeden N and Doyle J (1994). The reduced stability of plant alcohol dehydrogenase is due to the substitution of serine for highly conserved phenylalanine residue. *Plant Molecular Biology* **26**, 643-655.

- Glevarec G, Bouton S, Jaspard E, Riou MT, Cliquet JB, Suzuki A and Limami AM (2004). Respective roles of the glutamine synthetase/glutamate synthase cycle and glutamate dehydrogenase in ammonium and amino acid metabolism during germination and post-germinative growth in the model legume *Medicago truncatula*. *Planta* **219**, 286-97.
- Hacham Y, Avraham T and Amir R (2002). The N-terminal region of Arabidopsis cystathionine gamma-synthase plays an important regulatory role in methionine metabolism. *Plant Physiology* **128**, 454-62.
- Haldane JBS (1919). The combination of linkage value, and the calculation of distance between the loci of linked factors. *J. Genet.* **8**, 299-309.
- Hames BD, Hooper NM and Houghton JD (2000). "l'essentiel en biochimie," Berti editions, Paris.
- Hanson AD and Roje S (2001). One-Carbon Metabolism in Higher Plants. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology* **52**, 119-137.
- Hodges MD, Andrews CJ, Johnson DA and Hamilton RI (1997). Sensitivity of maize hybrids to chilling and their combining abilities at two developmental stages. *Crop Science* **37**, 850-856.
- Hund A, Fracheboud Y, Soldati A, Frascaroli E, Salvi S and Stamp P (2004). QTL controlling root and shoot traits of maize seedlings under cold stress. *Theoretical and applied genetics* **109**, 618-29.
- Ishimaru K, Ono K and Kashiwagi T (2004). Identification of a new gene controlling plant height in rice using the candidate-gene strategy. *Planta* **218**, 388-95.
- Jompuk C, Fracheboud Y, Stamp P and Leipner J (2005). Mapping of quantitative trait loci associated with chilling tolerance in maize (*Zea mays* L.) seedlings grown under field conditions. *Journal of experimental botany* **56**, 1153-63.
- Knott SA and Haley CS (1992). Maximum likelihood mapping of quantitative trait loci using full-sib families. *Genetics* **132**, 1211-22.
- Koch K (2004). Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. *Current Opinion in Plant Biology* **7**, 235-246.
- Kosambi D (1944). The estimation of map distance from recombination values. *Ann. Eug.* **12**, 172-175.
- Kreps JA, Wu Y, Chang H-S, Zhu T, Wang X and Harper JF (2002). Transcriptome Changes for Arabidopsis in Response to Salt, Osmotic, and Cold Stress. *Plant Physiology* **130**, 2129-2141.
- Lam HM, Coschigano KT, Oliveira IC, Melo-Oliveira R and Coruzzi GM (1996). The Molecular-Genetics of Nitrogen Assimilation into Amino Acids in Higher Plants. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology* **47**, 569-593.
- Lander ES and Botstein D (1989). Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* **121**, 185-99.
- Lander ES, Green P, Abrahamson J, Barlow A, Daly MJ, Lincoln SE and Newburg L (1987). MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* **1**, 174-81.
- Lea P and Joy K (1983). "Amino acids interconversion in germinating seeds," C Nozillo, PJ Lea, FA Loewus, Ed. Recent Advances in Phytochemistry, New York.
- Lea PJ and Mifflin BJ (1974). An alternative route for nitrogen assimilation in higher plants. *Nature* **251**, 614-616.
- Limami AM, Phillipson B, Ameziane R, Pernollet N, Jiang Q, Roy R, Deleens E, Chaumont-Bonnet M, Gresshoff PM and Hirel B (1999). Does root glutamine

- synthetase control plant biomass production in lotus japonicus L.? *Planta* **209**, 495-502.
- Limami AM, Rouillon C, Glevarec G, Gallais A and Hirel B (2002). Genetic and Physiological Analysis of Germination Efficiency in Maize in Relation to Nitrogen Metabolism Reveals the Importance of Cytosolic Glutamine Synthetase. *Plant Physiology* **130**, 1860-1870.
- Limami AM and de Vienne D (2001). Natural genetic variability in nitrogen metabolism. In "In PJ Lea, JF Morot-Gaudry" (P Nitrogen, ed.), pp. 368-397. Springer-Verlag, Heidelberg,.
- Liu J, Van Eck J, Cong B and Tanksley SD (2002). A new class of regulatory genes underlying the cause of pear-shaped tomato fruit. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **99**, 13302-6.
- Loudet O, Chaillou S, Merigout P, Talbotec J and Daniel-Vedele F (2003). Quantitative Trait Loci Analysis of Nitrogen Use Efficiency in Arabidopsis. *Plant Physiology* **131**, 345-358.
- Maimann S, Wagner C, Kreft O, Zeh M, Willmitzer L, Hofgen R and Hesse H (2000). Transgenic potato plants reveal the indispensable role of cystathionine beta-lyase in plant growth and development. *Plant Journal* **23**, 747-58.
- Masclaux C, Valadier MH, Brugiere N, Morot-Gaudry JF and Hirel B (2000). Characterization of the sink/source transition in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) shoots in relation to nitrogen management and leaf senescence. *Planta* **211**, 510-8.
- Miedema P (1982). The effects of low temperature on *Zea mays*. *Advances in Agronomy* **35**, 93-128.
- Mifflin BJ and Habash DZ (2002). The role of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in nitrogen assimilation and possibilities for improvement in the nitrogen utilization of crops. *Journal of experimental botany* **53**, 979-87.
- Millar AA, Olive MR and Dennis ES (1994). The expression and anaerobic induction of alcohol dehydrogenase in cotton. *Biochemical genetics* **32**, 279-300.
- Morot-Gaudry J-F (1997). "Assimilation de l'azote chez les plantes," Jean-François Morot-Gaudry/Ed. INRA, Paris.
- Muehlbauer GJ, Somers DA, Matthews BF and Gengenbach BG (1994). Molecular genetics of the maize (*Zea mays* L.) aspartate kinase-homoserine dehydrogenase gene family. *Plant Physiology* **106**, 1303-1312.
- Ortega JL, Temple SJ, Bagga S, Ghoshroy S and Sengupta-Gopalan C (2004). Biochemical and molecular characterization of transgenic *Lotus japonicus* plants constitutively over-expressing a cytosolic glutamine synthetase gene. *Planta* **219**, 807-18.
- Pastori GM and Foyer CH (2002). Common Components, Networks, and Pathways of Cross-Tolerance to Stress. The Central Role of "Redox" and Abscisic Acid-Mediated Controls. *Plant Physiology* **129**, 460-468.
- Rhodes D, Rich PJ and Brunk DG (1989). Amino acid metabolism of *lemna minor* L. *Plant Journal* **31**, 639-647.
- Ricoult C, Echeverria LO, Cliquet JB and Limami AM (2006). Characterization of alanine aminotransferase (AlaAT) multigene family and hypoxic response in young seedlings of the model legume *Medicago truncatula*. *Journal of experimental botany* **57**, 3079-3089.
- Rosen H (1957). Modified colorimetric analysis for amino acids. *Arch Biochem Biophys* **67**, 10-15.
- Sambrook J, Fritsch E and Maniatis T (1989). Molecular cloning, a laboratory manual.

- Servin B, Dillmann C, Decoux G and Hospital F (2002). MDM: A program to compute fully informative genotype frequencies in complex breeding schemes. *Journal of Heredity* **93**, 227-228.
- Stamp P (1984). Chilling tolerance of young plants demonstrated on example of maize (*Zea mays* L.). *Crop Science* **7(suppl.)**, 1-83.
- Tabuchi M, Sugiyama K, Ishiyama K, Inoue E, Sato T, Takahashi H and Yamaya T (2005). Severe reduction in growth rate and grain filling of rice mutants lacking OsGS1;1, a cytosolic glutamine synthetase1;1. *Plant Journal* **42**, 641-51.
- Touchard C (2006). Recherche de QTLs et choix de cibles stratégiques pour l'amélioration de la tolérance aux basses températures chez le maïs., Université de technologie Compiègne, France.
- Tuberosa R, Salvi S, Sanguineti MC, Landi P, Maccaferri M and Conti S (2002). Mapping QTLs regulating morpho-physiological traits and yield: case studies, shortcomings and perspectives in drought-stressed maize. *Ann Bot (Lond)* **89 Spec No**, 941-63.
- Van Ooijen J and Voorrips R (2001). Joinmap 3.0, software for the calculation of genetic linkage maps. In " Plant Research International", Wageningen, The Netherlands.
- Vauterin M and Jacobs M (1994). Isolation of a poplar and an Arabidopsis thaliana dihydrodipicolinate synthase cDNA clone. *Plant Molecular Biology* **25**, 545-50.
- Verwoerd TC, Dekker BM and Hoekema A (1989). A small-scale procedure for the rapid isolation of plant RNAs. *Nucleic acids research* **17**, 2362.
- Vincent R, Fraisier V, Chaillou S, Limami MA, Deleens E, Phillipson B, Douat C, Boutin JP and Hirel B (1997). Overexpression of a soybean gene encoding cytosolic glutamine synthetase in shoots of transgenic *Lotus corniculatus* L. plants triggers changes in ammonium assimilation and plant development. *Planta* **201**, 424-33.
- Wang X and Larkins BA (2001). Genetic Analysis of Amino Acid Accumulation in opaque-2 Maize Endosperm. *Plant Physiology* **125**, 1766-1777.
- Wang X, Stumpf DK and Larkins BA (2001). Aspartate kinase 2. A candidate gene of a quantitative trait locus influencing free amino acid content in maize endosperm. *Plant Physiology* **125**, 1778-1787.
- Wattebled F, Dong Y, Dumez S, Delvalle D, Planchot V, Berbezy P, Vyas D, Colonna P, Chatterjee M, Ball S and D'Hulst C (2005). Mutants of Arabidopsis lacking a chloroplastic isoamylase accumulate phytyglycogen and an abnormal form of amylopectin. *Plant Physiology* **138**, 184-95.
- Weil J (2001). "Biochimie générale," Dunod/Ed., Paris 9ème.
- Yano M, Katayose Y, Ashikari M, Yamanouchi U, Monna L, Fuse T, Baba T, Yamamoto K, Umehara Y, Nagamura Y and Sasaki T (2000). Hd1, a major photoperiod sensitivity quantitative trait locus in rice, is closely related to the Arabidopsis flowering time gene CONSTANS. *Plant Cell* **12**, 2473-2484.
- Yoshioka Y, Kurei S and Machida Y (2001). Identification of a monofunctional aspartate kinase gene of Arabidopsis thaliana with spatially and temporally regulated expression. *Genes and Genetic Systems* **76**, 189-198.
- Zeh M, Casazza AP, Kreft O, Roessner U, Bieberich K, Willmitzer L, Hoefgen R and Hesse H (2001). Antisense Inhibition of Threonine Synthase Leads to High Methionine Content in Transgenic Potato Plants. *Plant Physiology* **127**, 792-802.
- Zeng Y, Wu Y, Avigne WT and Koch KE (1998). Differential Regulation of Sugar-Sensitive Sucrose Synthases by Hypoxia and Anoxia Indicate Complementary Transcriptional and Posttranscriptional Responses. *Plant Physiology* **116**, 1573-1583.

- Zeng Y, Wu Y, Avigne WT and Koch KE (1999). Rapid Repression of Maize Invertases by Low Oxygen. Invertase/Sucrose Synthase Balance, Sugar Signaling Potential, and Seedling Survival. *Plant Physiology* **121**, 599-608.
- Zhu X and Galili G (2003). Increased Lysine Synthesis Coupled with a Knockout of Its Catabolism Synergistically Boosts Lysine Content and Also Transregulates the Metabolism of Other Amino Acids in Arabidopsis Seeds. *Plant Cell* **15**, 845-853.
- Zhu X and Galili G (2004). Lysine metabolism is concurrently regulated by synthesis and catabolism in both reproductive and vegetative tissues. *Plant Physiology* **135**, 129-36.
- Zhu-Shimoni JX and Galili G (1998). Expression of an Arabidopsis Aspartate Kinase/Homoserine Dehydrogenase Gene Is Metabolically Regulated by Photosynthesis-Related Signals but Not by Nitrogenous Compounds. *Plant Physiology* **116**, 1023-1028.
- Zhu-Shimoni JX, Lev-Yadun S, Matthews B and Galili G (1997). Expression of an Aspartate Kinase Homoserine Dehydrogenase Gene Is Subject to Specific Spatial and Temporal Regulation in Vegetative Tissues, Flowers, and Developing Seeds. *Plant Physiology* **113**, 695-706.

ANNEXES

Annexe 1 : alignement de séquence

Annexe 2 : article

Anzala F., Morère Le Paven M.-C., Fournier S., Rondeau D. and Limami A.M. (2006). Physiological and Molecular Aspects of Aspartate-Derived Amino Acid Metabolism During Germination and Postgermination Growth in Two Maize Genotypes Differing in Germination Efficiency. **Journal of experimental botany**. Vol.57 p 645-53

Annexe 3 : article

Anzala F., Morère Le Paven M.-C. et Limami A. M.. (2007). Etude de l'activité *in vivo* de l'aspartate kinase par suivi isotopique (^{15}N). **L'Actualité chimique** Vol.305 p 17-20

Annexe 4 : article

Anzala F., Morère-Le Paven M.-C., Birolleau-Touchard C., Giauffret C., and Limami A. M.. (2006). QTL mapping and genetic analysis of inhibitory effect of Lysine on postgermination growth and seedling establishment of Maize. **Acta Agronomica Hungarica** Vol. 54 n°3 p 271-279