l'université nantes angers le mans
PÔLE DE RECHERCHE ET D'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR

UNIVERSITÉ DE NANTES

Thèse de Doctorat

Marc-Marie Lechat

Mémoire présenté en vue de l'obtention du
grade de Docteur de l'Université de Nantes
sous le label de L'Université Nantes Angers Le Mans

École doctorale : *Végétal, Environnement, Nutrition, Agroalimentaire, Mer - VENAM*

Discipline : *Sciences du végétal*
Spécialité : *Physiologie cellulaire et moléculaire végétale*
Unité de recherche : *Laboratoire de Biologie et de Pathologie Végétales*

Soutenu le *07/11/2014*

Études des mécanismes impliqués dans la perception des molécules stimulant la germination des plantes parasites des genres *Orobanche* et *Phelipanche*

JURY

Président :	**Catherine RAMEAU**, Directeur de recherche, INRA Versailles
Rapporteurs :	**Annie MARION-POLL**, Directeur de recherche, INRA Versailles **Catherine RAMEAU**, Directeur de recherche, INRA Versailles
Examinateurs :	**Soizic ROCHANGE,** Maître de Conférences, Université Paul Sabatier (Toulouse 3) **Jean-Bernard POUVREAU,** Maître de Conférences, Université de Nantes **Séverine THOIRON**, Maître de Conférences, Université de Nantes
Directeur de Thèse :	**Philippe DELAVAULT**, Professeur, Université de Nantes
Co-encadrant de Thèse :	**Jean-Bernard POUVREAU,** Maître de Conférences, Université de Nantes
Co-encadrant de Thèse :	**Séverine THOIRON**, Maître de Conférences, Université de Nantes

UNIVERSITÉ DE NANTES
FACULTÉ DES SCIENCES ET DES TECHNIQUES

ÉCOLE DOCTORALE
VÉGÉTAL, ENVIRONNEMENT, NUTRITION, AGROALIMENTAIRE, MER (VENAM)

Année 2014

Études des mécanismes impliqués dans la perception des molécules stimulant la germination des plantes parasites des genres *Orobanche* et *Phelipanche*

THÈSE DE DOCTORAT

Discipline : Sciences du végétal
Spécialité : Physiologie cellulaire et moléculaire végétale

Présentée
et soutenue publiquement par

Marc-Marie LECHAT

Le 7/11/2014, devant le jury ci-dessous

Président	Catherine RAMEAU, Directeur de recherche, INRA Versailles
Rapporteurs	Annie MARION-POLL, Directeur de recherche, INRA Versailles
	Catherine RAMEAU, Directeur de recherche, INRA Versailles
Examinateurs	Soizic ROCHANGE, Maître de Conférences, Université Paul Sabatier (Toulouse 3)
	Jean-Bernard POUVREAU, Maître de Conférences, Université de Nantes
	Séverine THOIRON, Maître de Conférences, Université de Nantes

Directeur de thèse :

M. Philippe DELAVAULT

Remerciements

Avant de rentrer dans le vif du sujet et de parler de choses compliquées, place à l'aspect humain

Je tiens tout d'abord à remercier Madame Catherine Rameau et Madame Annie Marion-Poll d'avoir accepté d'être mes rapporteurs afin de me faire profiter de leur expertise dans l'évaluation de ce manuscrit.

Toute ma reconnaissance et ma gratitude vont également aux membres de mon comité de thèse, Monsieur Olivier Leprince et Monsieur Guillaume Bécard, pour m'avoir permis de prendre du recul sur mes travaux et pour m'avoir réorienté lorsqu'il le fallait.

Je tiens dans un premier temps à remercier très chaleureusement tous les membres du laboratoire LBPV, qui ont su partager l'expérience qui a été la mienne durant ces trois années de thèse. Vous avez tous contribué à l'avancement de ce projet aussi bien d'un point de vue scientifique qu'humain.

Par ces quelques mots, je tiens également à exprimer toute ma gratitude aux deux directeurs du LBPV, Monsieur Philippe Simier et Monsieur Philippe Delavault. Nous nous connaissons depuis plusieurs années maintenant, et vous m'avez vu évoluer. Merci de m'avoir accompagné durant ces trois ans, de m'avoir fait partager votre passion pour la recherche et de m'avoir permis de participer à des congrès internationaux et nationaux. Ces expériences m'ont permis de faire mes premiers pas dans le monde de la communication scientifique.

Je souhaite ensuite remercier tout particulièrement mes encadrants, mon directeur de thèse Philippe Delavaut, ainsi que mes deux co-encadrants Jean-Bernard Pouvreau et Séverine Thoiron. Viens ensuite le temps de remercier tous les membres de l'équipe du bureau 120, Zac pour ton calme et tes conseils qui ont été entendus, Michou pour ta bonne humeur continuelle et toutes les clopes taxées, Jean-Jean pour ton esprit scientifique, ta méthode du sous-marin, et la technique écureuil, MaMath pour m'avoir formé et supporté, Vincent pour la Geek Attitude, et Julien pour tes conseils scientifiques. Aux autres membres de la team du LBPV, JB pour m'avoir fait profiter de ton double cerveau et m'avoir équipé d'un décodeur permettant de comprendre ton flot de paroles, Séverine pour m'avoir supporté et m'avoir aidé à corriger mes nombreuses fautes d'orthographe, Greg pour ta bonne humeur constante entrecoupée de moment de baboulinet.

À tous les autres, je ne vous oublie pas non plus, Aude, ta bonne humeur et tes sourires m'ont permis d'évacuer une partie du stress généré par cette thèse, Antoine, tes bons petits plats me faisaient passer un très agréable moment, Sabine ton aide m'a été précieuse aussi bien dans ma thèse que lors des cours, Inès ton sourire matinal égayait mes journée et nous nous sommes mutuellement soutenus au cours de cette expérience qu'est la thèse, Natacha, même si nous ne nous sommes pas vus beaucoup, je tiens à te remercier pour le coup de main fourni dans mes manips.

Je souhaite également adresser tous mes remerciements à ma famille et aux personnes qui me sont proches. À mon père Dominique Lechat, qui a su me motiver et m'encadrer, tu vois j'y suis arrivé. À ma sœur Angelina Vestu, merci d'avoir été avec moi dans les bons et les moins bons moments, ton soutien m'a été vraiment utile. Mes sincères remerciements à Jean-Michel et Annie Magnenou, pour tous ces petits moments très agréables et appréciés. Merci également à Fabien Magnenou pour m'avoir aidé à corriger l'orthographe et les tournures de français. Vous trois, je vous apprécie et vous estime vraiment beaucoup.

SOMMAIRE

Remerciements 5

Sommaire 9

Liste des figures 15

Liste des tableaux 21

Liste des abréviations 23

Relevé de la production scientifique 25

Introduction générale 27

1. *Les Orobanchaceae*, un phylum aux stratégies parasitaires diversifiées 33
   1.1. *Les Orobanchaceae*, pathogène du genre *Orobanche* et *Phelipanche* 33
   1.2. Le cycle de vie de l'orobanche rameuse, *Phelipanche ramosa* 37
2. Dormance et germination des graines 41
   2.1. La régulation hormonale de la germination et de la dormance 45
   2.2. La germination de l'orobanche : une germination sous contrôle de l'hôte 51
   2.3. Les stimulants de germination : un signal chimique perçu par les plantes parasites 53
3. La voie de biosynthèse et de transduction des strigolactones 57
   3.1. La voie de biosynthèse des strigolactones 57
   3.2. La voie de transduction des strigolactones 59

Sujet de recherche 66

Études des mécanismes impliqués dans la perception des molécules stimulant la germination des plantes parasites des genres *Orobanche* et *Phelipanche*

Chapitre I 71

Induction strigolactone dépendante de *PrCYP707A1* : Gène de catabolisme de l'acide abscissique et acteur clé de la germination de *P. ramosa*

Introduction 73

1- Article publié: *PrCYP707A1*, an ABA catabolic gene, is a key component of *Phelipanche ramosa* seed germination in response to the strigolactone analogue GR24 75

2- Autres acteurs précoces impliqués dans la germination de *P. ramosa* en réponse au GR24 99

3- Évolution de l'expression de gènes marqueurs de l'équilibre hormonal ABA/GA dans la germination de *P. ramosa* en réponse au GR24 105
Conclusion 106

Chapitre II 111

L'expression d'un gène de catabolisme de l'ABA, *CYP707A*, en réponse aux stimulants de germination, est conservée dans les graines de plantes parasites et non parasites.

1-Introduction 113
2-Materiels et méthodes 115
2.1 Matériel végétal 115
2.2 Tests de germination et molécules utilisées 117
2.3 Préparation des échantillons 119
2.4 Extractions d'ARNs, clonages des ADNc et obtention des séquences CYP707A 119
2.5 Analyses en Real-Time PCR (RT PCR) 121
3-Resultats 123
3.1 La germination des plantes parasites obligatoires est sous le contrôle de l'induction stimulant dépendante d'un gène *CYP707A1*, assurant la dégradation de l'acide abscissique 123
3.2 Les strigolactones sont capable d'induire la surexpression du gène *TvCYP707A1* chez la plante parasite facultative *T. versicolor* 129
3.3 Histoire évolutive des CYP707A au sein des *Orobanchaceae* 131
3.4 Chez *A. thaliana* une voie de transduction du signal strigolactone menant à l'expression du gène *AtCYP707A3* au cou de la germination est présente 131
3.5 La voie de transduction du signal strigolactone menant à l'expression du gène *AtCYP707A3* au cours de la germination implique MAX2 135
4-Discussion 135
4.1 *CYP707A*, induit par les strigolactones au cours de la germination, un acteur conservé 136
4.2 La voie SG-dépendante au cours de la germination des plantes parasites facultatives et non parasites, une voie alternative 137
4.3 La voie de signalisation des strigolactones aboutissant à l'induction des gènes *CYP707A* est commune entre les espèces 138
4.4 La perception du SG, α/β hydrolases et diversité 139

Chapitre III **143**

La voie de transduction du signal strigolactone : De la perception à la germination

Introduction 145

1- Le protéasome 26S, un acteur de la transduction du signal Sl dans la germination de *P. ramosa* 147

2- Les α/β hydrolases, récepteurs putatifs des strigolactones chez *P.ramosa* 149

3- Impact d'un traitement lumineux sur la germination des graines de *P. ramosa* 153

4- Impact d'un stress oxydatif sur la germination des graines de *P. ramosa* 155

Conclusion 158

Chapitre IV **161**

La modulation du taux de méthylation des cytosines de l'ADN module la germination des graines de la plante parasite obligatoire *Phelipanche ramosa*

Introduction 163

1-Article soumis: DNA methylation modulates seed germination in response to strigolactone in the obligate root parasitic plant, *Phelipanche ramosa* L. Pomel 165

Conclusion 193

Conclusion générales et perspectives **197**

Références bibliographiques **209**

Annexes **235**

Resumé **265**

LISTES DES FIGURES

Introduction

Figure I.1: Diversité du parasitisme chez les plantes à fleurs.

Figure I.2: Classification des différents types de parasitisme végétal en fonction de leur lieu de fixation et de leur dépendance trophique vis-à-vis de leur hôte.

Figure I.3: Comparaison des caractéristiques évolutive entre les *Orobanchaceae*

Figure I.4: Distribution mondiale de *Phelipanche ramosa* L. Pomel.

Figure I.5: Carte de répartition de *Phelipanche ramosa* en France.

Figure I.6: Cycle biologique de *Phelipanche ramosa L.* Pomel.

Figure I.7: Évolution au cours du temps des évènements physiologiques et cellulaires majeurs liés à l'étape de germination et de post germination.

Figure I.8: Voie de biosynthèse et de catabolisme des GAs chez les plantes supérieures.

Figure I.9: Schéma de la voie de transduction des GA.

Figure I.10: Voie de biosynthèse et de catabolisme de l'acide abscissique.

Figure I.11: Modèle représentant comment l'H_2O_2, le NO, l'ABA, les GA et PED3 régulent la levée de dormance et la germination chez *A. thaliana.*

Figure I.12: Schéma des étapes de germination des graines d'orobanche à germination stimulant dépendante.

Figure I.13: Structures développées des strigolactones naturels et du strigolactone synthétique (GR24), induisant la germination des graines d'orobanche.

Figure I.14: Stimulants de germination de type Strigolactone-like.

Figure I.15: Stimulants de germination de type non-strigolactone.

Figure I.16: Voie de synthèse putative du 5-Doxystrigol et des autres strigolactones dérivés à partir des *trans*-β-carotène.

Figure I.17: Modèle de discrimination du signal buténolide et strigolactone par KAI2, AtD14 et MAX2 au cours du développement de la plante.

Figure I.18: Modèle proposé de la voie de transduction du signal strigolactone dans l'inhibition de la ramification du système aérien.

Chapitre I

Figure 1.1: Characterization of *P. ramosa* seed conditioning and germination.

Figure 1.2: Time-course of *PrCYP707A1* expression in 7 d conditioned seeds treated with 1 nM GR24.

Figure 1.3: Expression of *PrCYP707A1* and *PrCYP707A2* in seeds conditioned for 1, 3, 5 or 7 d and then treated for 6 h with 1 nM GR24.

Figure 1.4: *In situ* localization of *PrCYP707A1* transcripts in longitudinal sections of *P. ramosa* seeds.

Figure 1.6: Abz-E2B inhibition of *P. ramosa* seed germination.

Figure 1.7: Profils d'expression des gènes *PrHSC70*, *PrHSP90* et *PrROF1* dans les graines de *P. ramosa* en réponse au GR24.

Figure 1.8: Inhibitions de la germination des graines *P. ramosa* par le Radicicol et le FK506.

Figure 1.9: Inhibitions de la germination des graines de *P. ramosa* par un traitement conjoint Radicicol/FK506 en fonction de la concentration en GR24.

Figure 1.10: Profil d'expression des gènes marqueurs de la biosynthèse et de la signalisation de l'ABA et des GA au cours de la germination de *P. ramosa* en réponse au GR24.

Chapitre II

Figure 2.1: Cinétique de germination des plantes parasites obligatoires en réponse au GR24.

Figure 2.2: Relations structure-activité des stimulants de germination sur la germination des graines de plantes parasites obligatoires.

Figure 2.3: Les molécules qui induisent la germination des plantes parasites obligatoires entrainent une surexpression du gène *CYP707A1*.

Figure 2.4: La *CYP707A1* est la clé permettant de lever le verrou ABA inhibant la germination.

Figure 2.5: Cinétique de germination de la plante parasite facultative *T. versicolor* en réponse au GR24.

Figure 2.6: Le GR24 induit la surexpression spécifique du gène *TvCYP707A1* de *T. versicolor*.

Figure 2.7: Analyse phylogénétique des séquences protéiques CYP707A chez différentes espèces.

Figure 2.8: Cinétiques de germination d'*A. thaliana* Col-O WT et du mutant *max2* en réponse au GR24, en dormance primaire et en post maturation.

Figure 2.9: Le GR24 stimule la germination et l'expression MAX2-dépendante du gène *AtCYP707A3* chez des graines d'*A. thaliana* en dormance primaire.

Figure 2.10: Le gène *AtCYP707A3* est nécessaire à la réponse au GR24 des graines d'*A. thaliana* en dormance primaire.

Chapitre III

Figure 3.1: Implication du protéasome 26S dans la germination de *P. ramosa* et l'expression du gène *PrCYP707A1* en réponse aux Sl.

Figure 3.2: Les α/β hydrolases acteurs de la germination des graines de *P. ramosa*.

Figure 3.3: Les α/β hydrolases *PrD14* et *PrKAI2* sont surexprimées au cours du conditionnement.

Figure 3.4: La lumière n'impact pas de manière significative la germination de *P. ramosa*.

Figure 3.5: Un stress oxydatif médié par la voie du NO n'impact pas significativement la germination des graines de *P. ramosa*.

Chapitre IV

Figure 4.1: The conditioning period is not controlled by ABA.

Figure 4.2: A global DNA demethylation occurs during the conditioning period.

Figure 4.3: Global DNA methylation controls *PrCYP707A1* expression.

Figure 4.4: The hypermethylating hydroxyurea applied during conditioning inhibits GR24-dependent up-regulation of *PrCYP707A1* and germination.

Figure 4.5: DNA demethylation occurs in the promoter of *PrCYP707A1*.

Figure 4.6: DNA demethylation occurs in a 78 bp region of the *PrCYP707A1*promoter.

Conclusion générale et Perspectives

Figure C.1 : Schéma hypothétique des mécanismes impliqués dans la perception des stimulants de germination menant à la germination des plantes parasites des genres *Orobanche* et *Phelipanche*, basé sur le modèle de *Phelipanche ramosa*.

LISTE DES TABLEAUX

Introduction

Table I.1 : Principales espèces d'orobanches pathogènes de cultures d'intérêts et leurs hôtes.

Chapitre I

Table 1.1: List of TDFs modulated in *P. ramosa* conditioned seeds treated for 2 h or 6 h with GR24

Chapitre II

Table 2.1: Amorces RT-PCR utilisées dans cette étude.

Chapitre IV

Table 4.1: Primers used in this study

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

ABA : Acide abscissique

Ac : Acétone

AFLP : Polymorphisme de longueur des fragments amplifiés

AMPc : Adénosine monophosphate cyclase

ABRE : Élément de réponse à l'ABA

BR : Brassinostéroïde

CCD : Carotenoide clivage dioxygenase

CDS : Séquence codante

CM : Milieu de conditionnement

CpG : Cytosine phosphate Guanine

DCL : Dehydrocostus lactone

FL : Pleine longueur

GA : Gibbérelline

GGDP : Géranylgéranyl diphosphate

GR24 : G. Roseberry 24

GS/SG : Stimulants de germination

H_2O_2 : peroxyde d'hydrogène

ITC : Isothiocyanate

Mio : Million

Mrds : Milliard

NCED : Nine-cis-epoxycarotenoid Dioxygenase

NO : Oxide nitrique

PD : Dormance primaire

PMSF : Acide phénylmethane sulfonique

PS : Dormance secondaire

SL : Strigolactone

SL-like : Strigolactone Like

SMXL : SUPPRESSOR OF MORE AXILLARY GROWTH2 1-LIKE

PG : Polygalacturonase

PGIP : Inhibiteur de polygalacturonase

RELEVÉ DE LA PRODUCTION SCIENTIFIQUE

Publications :

=>Chapitre 1

Lechat MM, Pouvreau JB, Peron T, Gauthier M, Montiel G, Veronesi C, Todoroki Y, Le Bizec B, Monteau F, Macherel D, **Simier P, Thoiron S, Delavault P.** 2012. *PrCYP707A1*, an ABA catabolic gene, is a key component of *Phelipanche ramosa* seed germination in response to the strigolactone analogue GR24. *Journal of Experimental Botany* **63**,5311–5322.

=>Annexe 1

Pouvreau JB, Gaudin Z, Auger B, Lechat MM, Guthier M, Delavault P, Simier P. 2013. A high-throughput seed germination assay for root parasitic plants. *Plant methods* **9**, 32.

Congres scientifiques :

12th World Congress on Parasitic Plants 15-20 July 2013, Sheffield, UK

Lechat MM, Philippe G, Pouvreau JB, Montiel G, Simier P, Thoiron S and Delavault P. *CYP707A1*, an ABA catabolic gene, is a ubiquitous component of parasitic plants seed germination in response to various germination stimulants. *Presentation oral.*

STREAM COST action 1206; 1st MEETING Jerusalem, ISRAEL, NOVEMBER 3-7, 2013

Lechat MM, Philippe G, Pouvreau JB, Montiel G, Veronesi C, Simier P, Thoiron S, Delavault P. *PrCYP707A1*, an early response gene to strigolactones, is a ubiquitous key requires fore germination of parasitic plants. *Présentation de Poster.*

Graines 2013, Dijon 30 et 31 Octobre 2013, 4ème colloque national du réseau français de biologie des graines

Lechat MM, Philippe G, Pouvreau JB, Montiel G, Veronesi C, Simier P, Thoiron S, Delavault P. *PrCYP707A1*, un gène de réponse précoce aux strigolactones, est une clé requise pour la germination des plantes parasites. *Présentation de Poster.*

Introduction

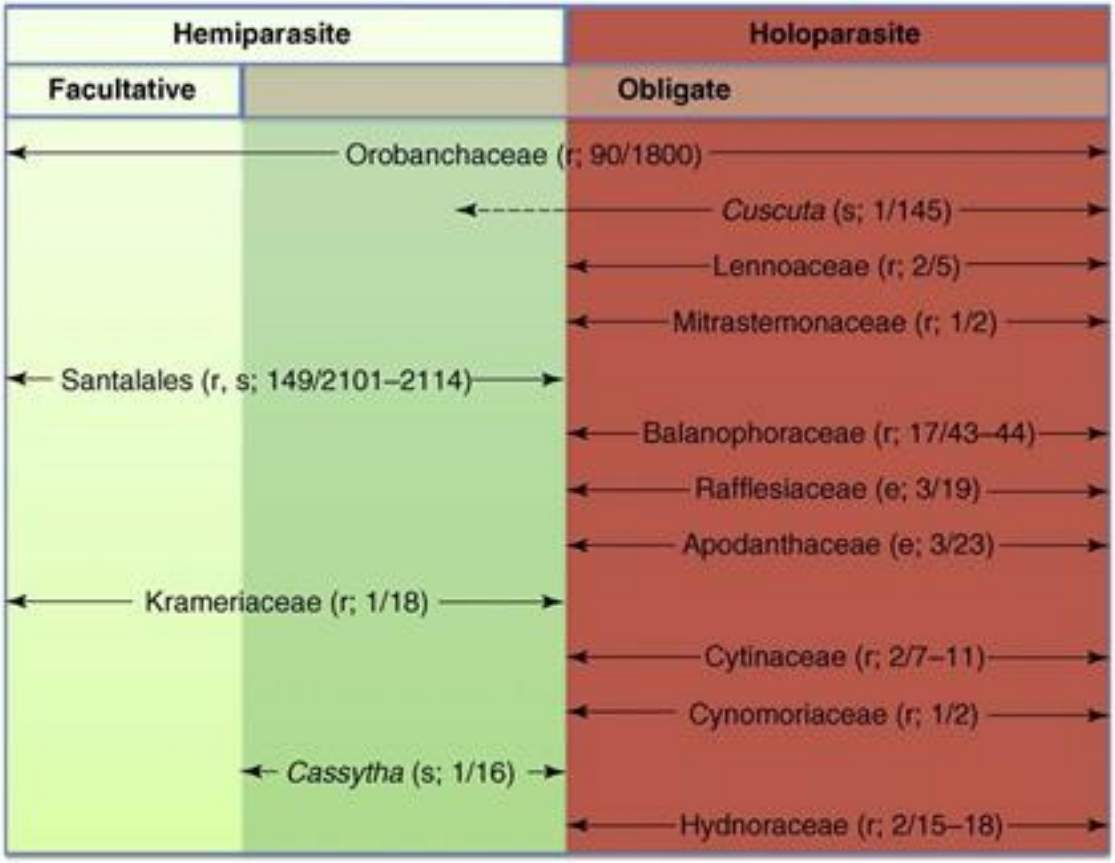


Fig. I.1 Diversité du parasitisme chez les plantes à fleurs. (Westwood *et al.*, 2010)

Lieu de fixation : r => Racine ; s => Tige ; e => Endophyte interne majoritairement
x/y : nombre de genres et d'espèces estimés

Introduction

Le parasitisme se définit comme une relation trophique en sens unique entre au moins deux individus, dont seul l'un d'entre eux retire un bénéfice. L'individu tirant avantage de cette interaction est alors appelé « parasite », tandis que l'autre partenaire portant le parasite est appelé « hôte » (Toft and Karter, 1990).

Au cours de l'évolution, certaines plantes ont développé la capacité à parasiter d'autres plantes, c'est-à-dire qu'elles se fixent sur une plante hôte afin de détourner certaines substances nutritives pour leur propre développement. À ce jour, toutes les plantes parasites décrites appartiennent aux Angiospermes Dicotylédones. Le nombre exact de plantes parasites reste pour autant indéterminé, mais certaines études mettent en évidence qu'environ 1% des phanérogames sont des plantes parasites (Raynal-Roques et Paré, 1998). Malgré ce faible pourcentage, cela représente environ 4200 espèces, distribuées en 22 familles et 273 genres (Fig. I.1), présents sur l'ensemble du globe (Nickrent et *al.*, 1998 ; Westwood et *al.*, 2010).

Les plantes parasites sont caractérisées par le partage d'un organe de contact avec leur hôte grâce à une structure particulière appelée *haustorium* (Westwood et *al.*, 2010). Celui-ci se définit comme étant un organe modifié qui permet d'établir un pont morpho-physiologique entre le parasite et l'hôte, au niveau des tissus conducteurs. Ce lien intime permet alors au parasite de prélever les éléments nutritifs chez son hôte (Kuijt, 1977 ; Ozenda and Capdebon, 1979). L'apparition de l'*haustorium* fut l'évènement évolutif clef qui permit la transition vers le mode de vie parasitaire (Westwood et *al.*, 2010).

Malgré le partage de cette structure commune qu'est l'*haustorium*, les stratégies parasitaires sont en revanche diversifiées. Il est alors possible de distinguer les plantes parasites dont l'*haustorium* s'installe au niveau des parties aériennes de l'hôte, les **épiphytes** (*Viscaceae*, *Convolvulaceae*, *Lauraceae…*), de celles se fixant au niveau des racines, les **épirhizes** (*Orobanchaceae*, *Hydnoraceae*, *Rafflesiaceae*…). Elles peuvent par ailleurs être des parasites **obligatoires** ou **facultatifs** (Seel and Jeschke, 1999). Les premières, contrairement aux secondes, nécessitent l'association obligatoire à un hôte pour effectuer leur cycle de développement. Le type de connexion au sein de l'haustorium entre les tissus de l'hôte et du parasite permet également de distinguer les « phloem feeder », obligés de prélever tous les éléments nutritifs utiles à leur développement au niveau du phloème, des « xylem feeder» ne prélevant chez leur hôte que les éléments permettant de réaliser la photosynthèse, tels que l'eau et les sels minéraux véhiculés par la sève brute (Hibberd et Jeschke, 2001). Les plantes

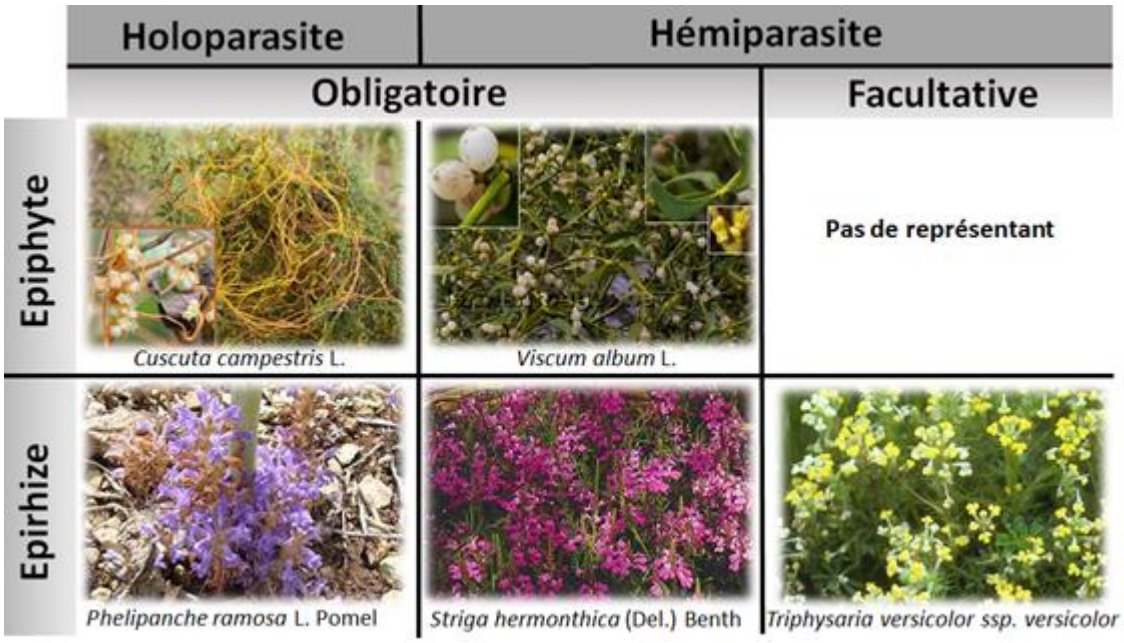


Fig. I.2 Les différents types de parasitisme végétal en fonction de leur lieu de fixation et de leur dépendance trophique vis-à-vis de leur hôte.

parasites adoptent également des comportements trophiques variés vis-à-vis de leurs hôtes. À ce titre, on différencie d'une part les plantes **holoparasites**, achlorophylliennes et hétérotrophes (*Rafflesia*, *Orobanche*, *Cuscute*…), et d'autre part les plantes **hémiparasites**, chlorophylliennes et partiellement hétérotrophes (*Viscum*, *Striga*, *Triphysaria*…) (Fig. I.2). Les processus de germination sont également variables au sein des plantes parasites. Ceux-ci vont d'une germination semblable à celle des plantes non parasites, jusqu'à une germination dépendante des stimulants chimiques émis par la plante hôte. Enfin, les profils d'agressivité présentent aussi une grande diversité, allant d'espèces polyphages (*P. ramosa* L. Pomel) à des espèces spécialisées sur un seul hôte (*O. cumana*).

Si on résume l'ensemble de ces critères, les holoparasites sont des parasites obligatoires, généralement « phloem feeder », pouvant être épiphytes (*Cuscuta sp.*) ou épirhizes (*Orobanche sp.*), à germination simulant dépendantes (*Orobanche sp.*) ou indépendantes (*Lathrea sp.*). La diversité est encore plus marquée chez les hémiparasites. Ainsi, le gui (*Viscum album*) est parasite obligatoire, épiphyte, « phloem feeder » alors que *Triphysaria sp.*, est un parasite facultatif épirhize et « xylem feeder ».

Au sein des agrosystèmes, certaines plantes parasites sont de redoutables phytopathogènes. C'est en particulier le cas de la famille des *Orobanchaceae* avec les genres *Striga* et *Orobanche*. En Afrique sub-saharienne, 40% des cultures céréalières sont infestées par *Striga spp*. Celui-ci entraine des pertes de rendement de 30 à 90%, affectant plus de 100 Mio de personnes (Scholes and Press, 2008) et représentant des pertes de l'ordre de 10 Mrds de dollars (Westwood et *al.*, 2010). En ce qui concerne les orobanches, certaines espèces comme *Phelipanche ramosa*, *Orobanche cumana*, ou encore *Orobanche minor* s'attaquent à des cultures à forte valeur économique, respectivement le colza (*Brassica napus* L.)(Auger et *al.*, 2012.), le tournesol (*Helianthus annuus* L.) (Labrousse et *al.*, 2001) et les légumineuses (Thorogood et *al.*, 2009), entrainant de fortes pertes de rendements pouvant aller jusqu'à 100%. À ce jour, et malgré les différentes recherches effectuées, il n'existe aucun moyen de lutte efficace contre ces pathogènes.

1. Les *Orobanchaceae* un phylum aux stratégies parasitaires diversifiées

1.1. Les pathogènes du genre *Orobanche* et *Phelipanche*

La famille des *Orobanchaceae*, regroupe plus de 170 espèces qui – à l'exception du genre *Linderbergia* – sont toutes des plantes parasites épirhizes (Olmstead et *al.*, 2001). L'événement d'apparition de l'*haustorium* issu des racines fut l'évènement évolutif clef qui permit la

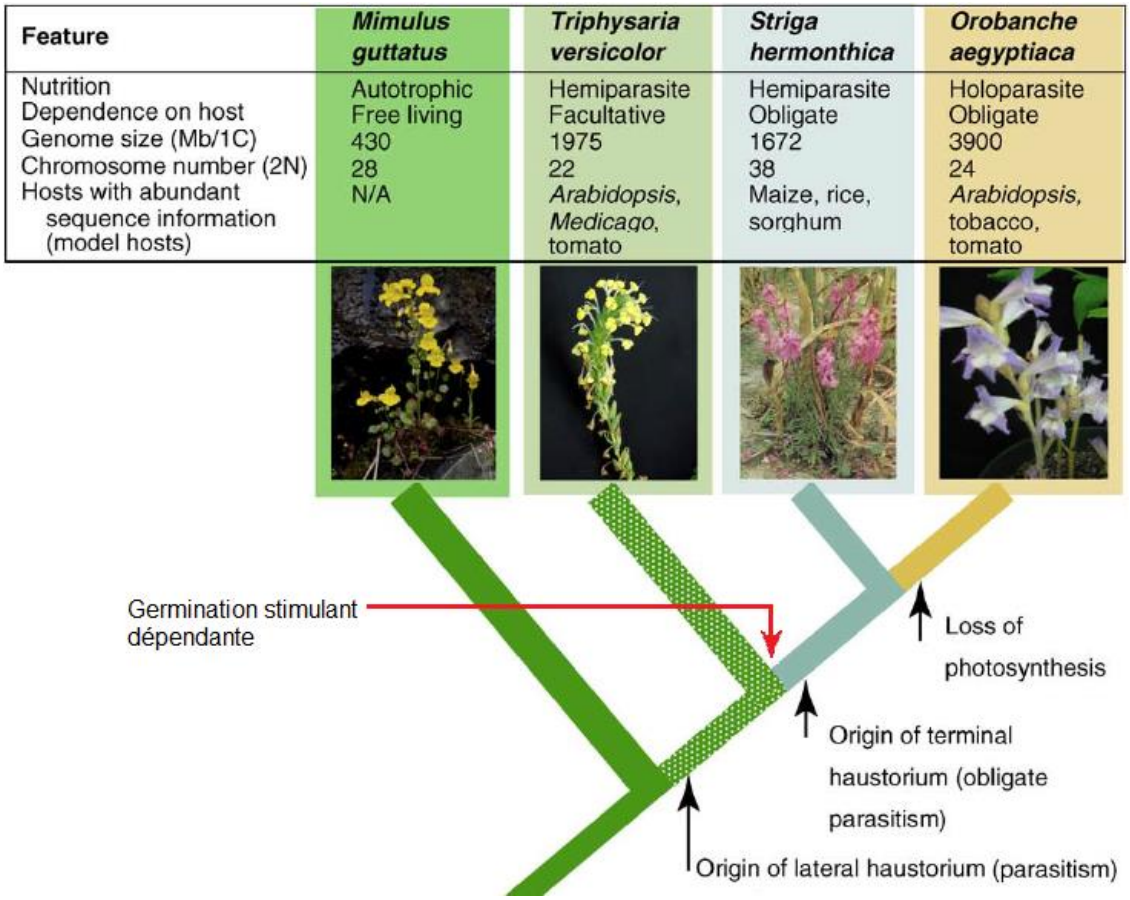


Fig. I.3 Relation évolutive entre les *Orobanchaceae*. (D'après Westwood *et al.* 2010)

Fig. I.4 Distribution mondiale de *Phelipanche ramosa* L. Pomel. (*D'après Parker, 2012*)

transition vers le mode parasitaire au sein de ce phylum (Westwood et *al.*, 2010). Ce groupe monophylétique présente par la suite une grande diversité de stratégies parasitaires avec une gradation de la dépendance à l'hôte : des hémiparasites facultatifs (*Triphysaria*), vers les hémiparasites obligatoires (*Striga*), jusqu'aux holoparasites (*Orobanches*). Le système de fixation à l'hôte suit également ce schéma de dépendance. Les hémiparasites facultatifs présentent de nombreux *haustoria* latéraux qui se développent sur les cotés des racines uniquement lors de leur entrée en contact avec une racine hôte (*Triphysaria*), alors que les parasites obligatoires (*Striga* et *Orobanche*) ne présentent qu'un *haustorium* terminal unique. Cet *haustorium* se développe alors à la pointe de la radicule et conditionne, par sa fixation, le développement ultérieur du parasite.

Les stratégies de germination des graines de ces plantes parasites suivent également ce schéma de dépendance accrue à l'hôte au cours de l'évolution. Les hémiparasites facultatifs tel que *Triphysaria versicolor ssp*. ont un mécanisme de germination semblable aux plantes non parasites, uniquement tributaire des conditions environnementales. Les hémiparasites obligatoires, eux, présentent une germination dépendante de signaux chimiques émis par l'hôte (*Striga spp.*). De même, les holoparasites entièrement dépendants de leur hôte comme les *Orobanches*, ne germent qu'en réponse à des stimuli chimiques émis par la plante hôte (Fig. I.3).

Les *Orobanches* regroupent des herbacées annuelles Dicotylédones holoparasites épirhizes, subdivisées en deux groupes : les *Orobanches* ou *Osproleon* et les *Phelipanches* (Schneeweiss et *al.*, 2004). Ce dernier groupe est subdivisé en 3 clades *: Trionychon*, *Myzorrhiza* et *Gymnocaulis* (Olmstead et *al.*, 2001). Les *Orobanches* présentent un caryotype à 2n=38 chromosomes contrairement aux espèces apparentées aux *Phelipanche* (2n=24).
Les orobanches sont réparties sur tous les continents dans la zone intertropicale. Elles affectent principalement l'Europe, l'Afrique et l'Asie, autour du bassin méditerranéen (Fig. I.4). Une vingtaine d'espèces d'orobanches sont considérées comme des phytopathogènes pour les espèces cultivées (Schneeweiss et *al.*, 2004). Elles représentent un réel problème agronomique avec près de 16 Mio d'hectares de terre infestées au niveau du bassin méditerranéen (Qasem, 2006). Sept d'entre elles sont responsables de la majorité des dégâts infligés : *O. cumana* Wallr., *O. cernua* Forsk., *O. minor* Sm., *O. foetida* Poir., *P. aegyptiaca* Pers., et *P. ramosa* L. Pomel (Tab. 1).

L'orobanche rameuse nourrit plus particulièrement en France des inquiétudes du fait de son large spectre d'hôte et de ses impacts sur les agrosystèmes (Tabac, chanvre, colza,

Tableau I.1 Principales espèces d'orobanches pathogènes de cultures d'intérêts et leurs hôtes. (Kasasian, 1971 ; Pieterse, 1979 ; Musselman, 1980 ; Foy *et al.*, 1989 ; Linke *et al.*, 1989)

XXX : infestation sérieuse
XX : infestation moyenne
X : faible infestation

Nom latin	Nom français	*O. cumana*	*O. cernua*	*O. crenata*	*O. minor*	*O. foetida*	*P. ramosa*	*P. aegyptiaca*
APIACEAE								
Apium spp.	Céleri			X	X		X	X
Daucus carota L.	Carotte			XX	X		X	X
Pastinaca sativa L.	Panais						X	X
ASTERACEAE								
Carthamus spp.	Carthame			X	X		XX	XX
Helianthus anuus L.	Tournesol	XXX	X	X	X		XX	XX
Lactuca spp.	Laitue			X	X		X	X
BRASSICACEAE								
Brassica spp.	Colza, moutarde…						XXX	XX
CANNABINACEAE								
Cannabis sativa L.	Chanvre						X	XX
CUCURBITACEAE								
Cucumis spp.	Melon, Concombre…			X			XX	XX
Cucurbita spp.	Courges						XX	XX
Citrullus lanatus (T.)	Pastèque							XX
FABACEAE								
Arachis hypogaea L.	Arachide			X	X		X	X
Cicer arietinum L.	Pois chiche			XX		XX	X	X
Lens culinaris Medik.	Lentille			XX	X	X	X	X
Lotus spp.	Lotier				X	X		
Medicago sativa L.	Luzerne				X	XX		
Pisum sativum L.	Pois			XX			X	X
Trifolium spp.	Trèfle				XXX	XX	X	X
Vicia faba L.	Fève			XXX	X	XXX	X	X
Vicia sativa L.	Vesce			X		XXX	X	X
SOLANACEAE								
Nicotiana tabacum L.	Tabac	X	XXX		X		XXX	XXX
Solanum lycopersicum L.	Tomate	X	XX	X			XXX	XXX
Solanum melongena L.	Aubergine	X	XX				XXX	XXX
Solanum tuberosum L.	Pomme de terre		X				XX	XX

etc…). Une expansion de ce parasite a en effet été soulignée par les centres techniques (CETIOM) (Fig. I.5). Ainsi, sur 1,5 million d'hectares de cultures de colza en France, on estime que 5% sont infestés par l'orobanche rameuse. Dans certaines régions, notamment le Poitou-Charentes, *P. ramosa* est devenue préoccupante non seulement pour la culture du colza mais aussi celle du chanvre textile. Elle a de ce fait été récemment inscrite dans le programme de biovigilance du territoire (dispositif du suivi des flores des zones cultivées/DGAL-SDPV).

Le succès de ce parasite au sein des agrosystèmes peut être relié à son cycle de vie singulier.

1.2. Le cycle de vie de l'orobanche rameuse, *Phelipanche ramosa*

L'orobanche rameuse possède un cycle de vie atypique du fait de son mode de vie parasitaire, plusieurs des étapes clés de son développement sont en effet sous contrôle de son hôte. Ce cycle, adapté au parasitisme, se déroule en deux étapes distinctes : une phase de développement souterrain, qui débute avec la germination, et une phase aérienne qui s'achève par la mise à fleur et la fructification de la plante (Fig. I.6). L'orobanche synchronise son cycle de développement sur celui de la plante hôte par le contrôle de sa germination et celui de son développement (Brault et *al.*, 2007 ; Gibot-Leclerc et *al.*, 2012, 2013).

La phase de vie parasitaire débute après accrochage du parasite sur les racines de son hôte via un *haustorium* terminal. La radicule de *P. ramosa* entre en contact avec la racine hôte, où son extrémité se différencie alors en *appressorium*. Les radicules n'ayant pas rencontré de racines rapidement se nécrosent. La progression des cellules de l'*haustorium* dans la racine de l'hôte se fait par l'intermédiaire de pressions mécaniques couplées à une dégradation enzymatique des parois des cellules corticales de la racine de l'hôte par des activités de type pectine méthylestérases et polygalacturonases (Ben-Hod et *al.*, 1997; Losner-Goshen et *al.*, 1998; Veronesi et *al.*, 2007). Une fois l'endoderme franchi, les cellules de l'orobanche vont mettre en place un *haustorium*. Les processus contrôlant la mise en place de cette interaction restent cependant encore mal caractérisés pour l'orobanche rameuse. La radicule s'oriente probablement par chimiotropisme positif vers la racine hôte (Dube and Olivier, 2001; Bouwmeester et *al.*, 2003) mais les composés induisant la formation de l'*haustorium* ne sont pas encore clairement identifiés chez les orobanches, contrairement à *Striga hermonthica* ou *Triphysaria versicolor ssp.*. Chez ces dernières, l'induction haustoriale est provoquée par des composés chimiques produits par la racine hôte qui appartiennent à la famille des quinones et des flavonoïdes (Steffens et *al.*, 1982 ; Riopel and Timko 1995, Keyes et *al.*, 2000).

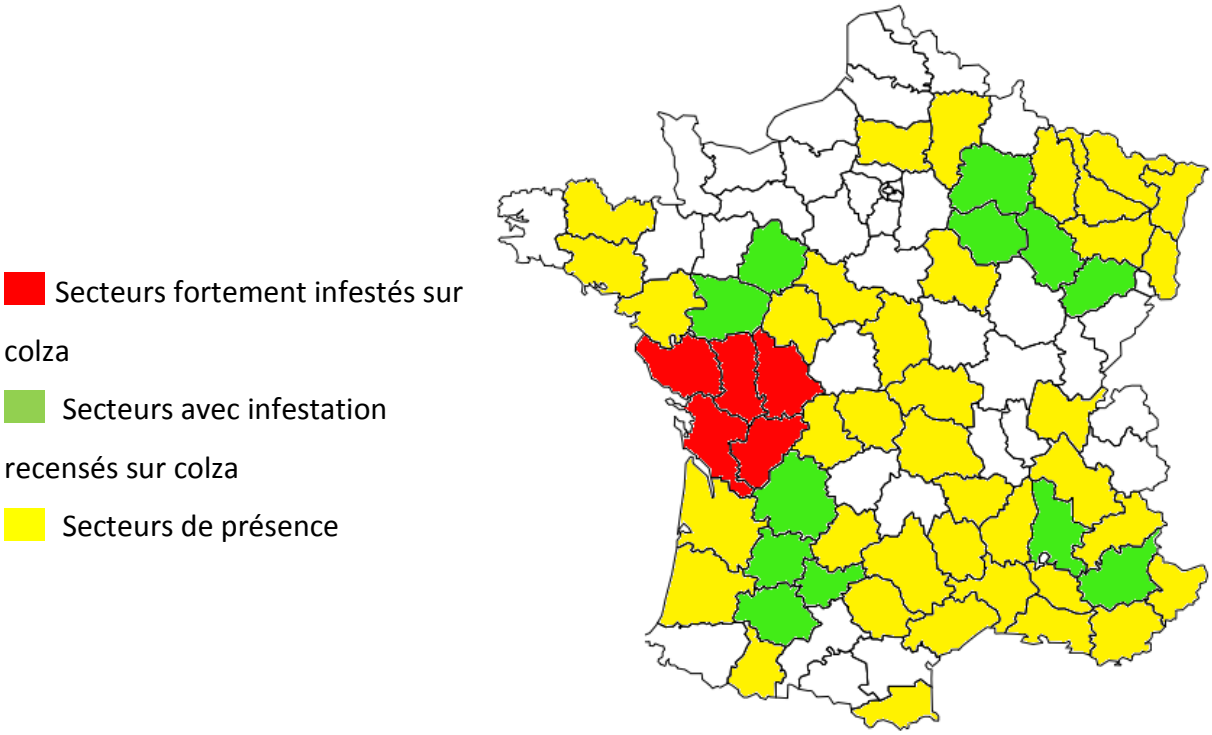


Fig. I.5 Carte de répartition de *Phelipanche ramosa* en France. (*D'après CETIOM 2011, Tela Botanica 2013*)

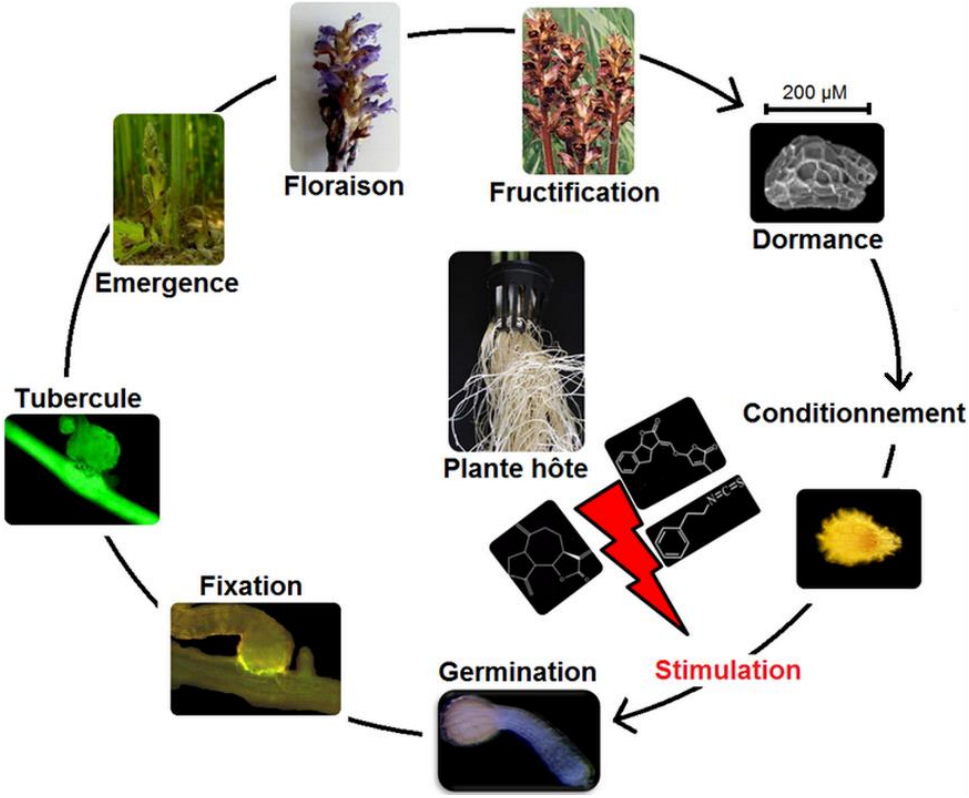


Fig. I.6 Cycle biologique de *Phelipanche ramosa*

Les étapes de dormance, de conditionnement, de stimulation, de germination, de fixation et le stade tubercule sont des phases souteraines. Les étapes d'emergence, de floraison et de fructification sont des phases aériennes.

Une fois l'orobanche fixée, un tubercule accumulant les réserves, principalement des hexoses, du mannitol et des acides aminés, va alors se former et grossir pendant 2 à 4 semaines (Singh et *al.*, 1968; Aber et *al.*, 1983; Abbes et *al.*, 2009; Draie, 2009). Après quelques semaines de vie souterraine, une tige achlorophyllienne écailleuse émerge du sol. Tout au long de cette vie fixée sur la racine, l'orobanche se comporte comme un puits surnuméraire vis-à-vis de l'hôte (Péron, 2010, thèse de doctorat). Elle draine les éléments qui lui sont nécessaires à partir du phloème de l'hôte (Hibberd et *al.*, 2001) tels que l'eau, les sels minéraux, le saccharose, acides aminés et autres composés carbonés (Hibberd et al., 2001 ; Aber et al., 1983 ; Abbes et *al.*, 2009). L'orobanche met en place des activités permettant d'optimiser ces prélèvements (invertase, M6PR), en modifiant sa pression osmotique durant la phase de développement du tubercule (Delavault et al., 2002).

Des hampes florales comportant chacune plusieurs dizaines de fleurs s'épanouissent au pied de la plante hôte. Après fécondation, la capsule de chaque fleur libère une très grande quantité de graines. Leur extraordinaire et redoutable capacité de dissémination réside dans le fait que chaque plante peut produire jusqu'à 500 000 graines, de petite taille (200 à 400 µm), et donc facilement véhiculées par le vent ou les outils agricoles (Mesa-García et *al.*, 1986, Jacobsohn et *al.*, 1987, Castejón-Muñoz et *al.*, 1991).

Par ailleurs, les graines peuvent rester viables pendant plus de 10 ans, ce qui permet d'entretenir et d'amplifier l'inoculum du sol (Prider et *al.*, WCPP 2012, Sheffield UK). Ces graines sont composées d'approximativement 300 cellules (Joel et *al.*, 1995a), et sont caractérisées par une ornementation alvéolaire spécifique de l'espèce (Plaza, 2004). Elles sont ovoïdes et contiennent des réserves principalement lipidiques (Bar-Nun and Mayer, 2002). La graine renferme un embryon elliptique indifférencié qui est dépourvu de radicule, de gemmule et de cotylédon. Cet embryon est entouré d'un albumen et d'un périsperme (Plakhine et *al.*, 2012) constitué de 3 ou 4 couches de cellules recouvert par les téguments.

Les graines présentes dans le sol doivent tout d'abord passer par une période dite de « conditionnement » durant laquelle elles doivent être exposées à des paramètres définis de température et d'hygrométrie. Ce conditionnement permet de rendre les graines aptes à poursuivre leur germination (Gibot-Leclerc et *al.*, 2004; Song et *al.*, 2005). À l'issue de cette phase, les graines n'achèvent leur germination qu'après perception d'un stimulus chimique contenu dans les exsudats racinaires de l'hôte. La germination se caractérise alors par la sortie d'une radicule au niveau du pôle micropylaire (Dube and Olivier, 2001; Bouwmeester et *al.*, 2003). L'étape de germination – sous contrôle de la perception de molécules stimulatrices

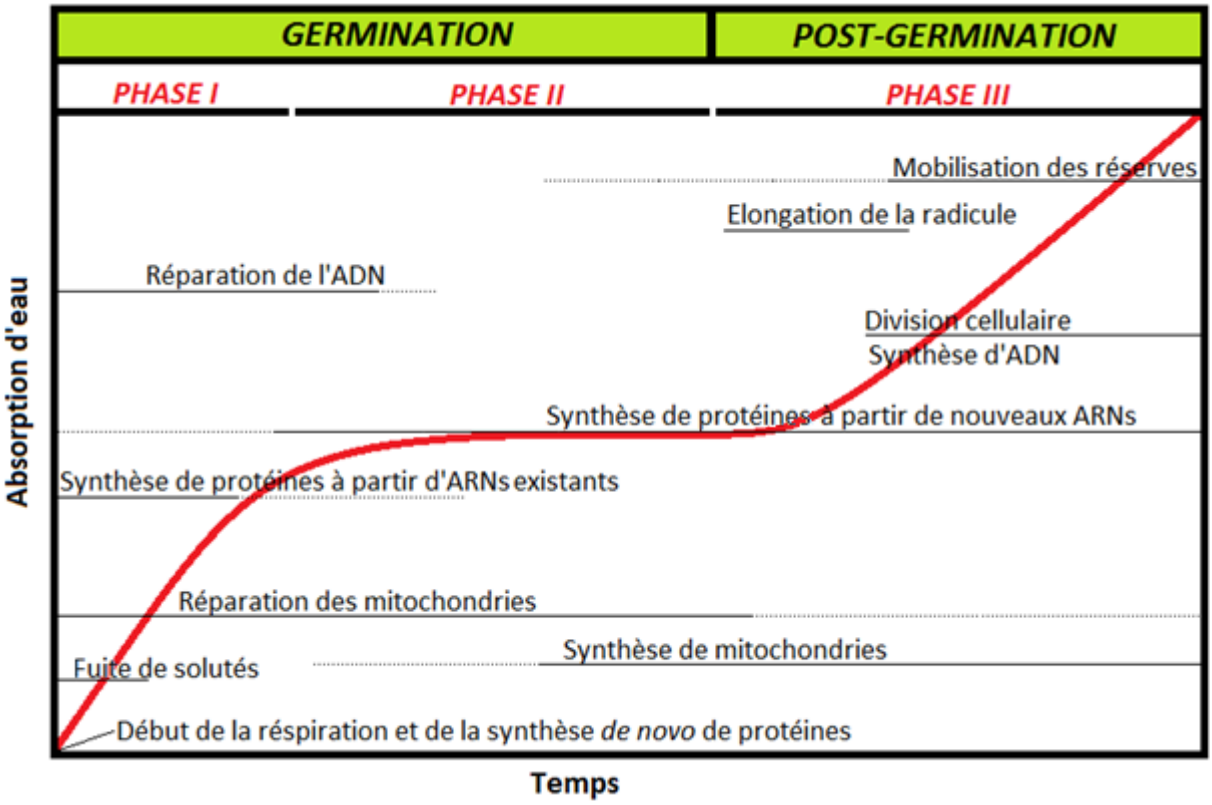


Fig. I.7 Évolution au cours du temps des évènements physiologiques et cellulaires majeurs liés à l'étape de germination et de post germination. *(D'après Bewley, 1997*)

Seules les phases I et II correspondent à la germination au sens strict, la phase III est une phase de croissance post-germinative. La durée totale et de chaque phase dépend principalement des conditions de germination et de l'espèce considérée.

exsudées par les racines hôtes – est donc l'une des étapes clé de ce cycle particulier. Elle permet à l'orobanche de relancer son cycle de développement en présence d'une plante hôte. La nature des stimulants perçus va également participer à l'agressivité des plantes d'orobanche et à la définition de leur spectre d'hôte. Alors que la majorité des orobanches germent en réponse aux strigolactones (SL), certaines sont en plus sensibles à des stimulants de germination exsudés spécifiquement par leurs plantes hôtes. Par exemple, *P. ramosa* est capable de germer en réponse aux Isothiocyanates (ITC) présents dans la rhizosphère du colza (Auger at *al.*, 2012) et *O. cumana* au Dehydrocostus lactone exsudé dans la rhizosphère par le tournesol, son hôte spécifique (Joel et *al.*, 2011).

2. Dormance et germination des graines

- *La germination des graines*

La germination des graines se définit comme la phase transitoire de sortie de vie au ralenti, comprenant la somme des évènements entre le stade graine sèche et la protrusion de la radicule (Bewley and Black, 1994).

La germination au sens strict est composée de deux phases distinctes (Fig. I.7) (Bewley, 1997). Elle commence avec l'imbibition rapide des tissus (phase I), entrainant la reprise rapide du métabolisme respiratoire. Elle est suivie d'une reprise du développement, avec mobilisation des réserves, phase caractérisée par un plateau dans l'absorption de l'eau (phase II, préparation métabolique). La germination se termine ensuite par l'allongement de l'axe embryonnaire avec la protrusion de la radicule (Bewley and Black, 1994). La phase III (post-germination) est marquée par une nouvelle prise d'eau et initie le développement post-germinatif de la plantule.

Après l'absorption d'eau initiale lors de la phase I, une fuite immédiate et rapide de solutés est observée. Celle-ci s'explique par un changement d'état des composants phospholipidiques des membranes, passant d'une structure en gel à une structure cristalline (Crowe and Crowe, 1992). Cette phase est également marquée par la reprise du métabolisme, d'abord au niveau respiratoire puis au niveau de la consommation des sucres, détectable après seulement quelques minutes. Parallèlement, les mitochondries présentes dans les tissus de la graine sont capables d'assurer un apport adéquat en ATP afin de soutenir le métabolisme pendant plusieurs heures après le début de l'imbibition (Ehrenshaft and Brambl, 1990 ; Attucci *et al.*, 1991). Des ARN déjà présents permettent également la synthèse de protéines afin d'assurer toutes les fonctions métaboliques essentielles, peu de nouveaux ARN semblent être transcrits (Bewley, 1982 ; Beltrán-Peíia et *al.*, 1995). Au cours de la seconde phase de

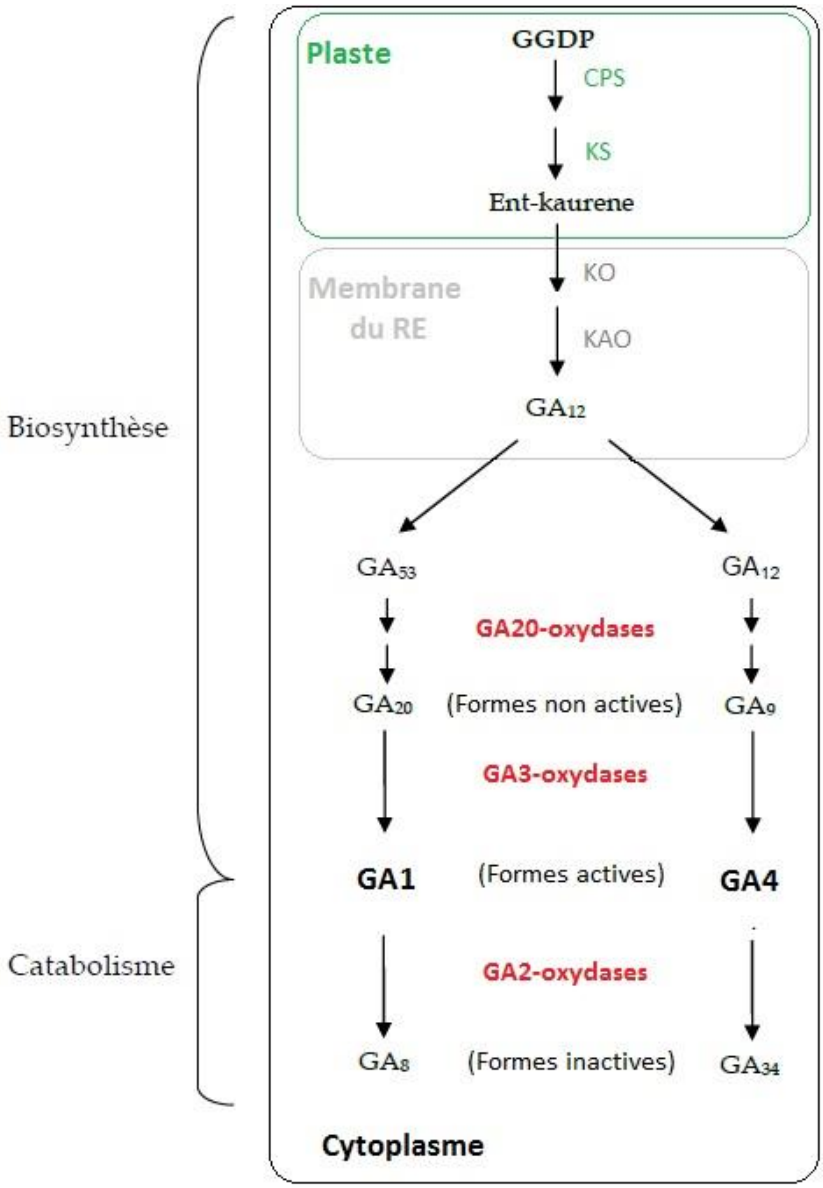


Fig. I.8 Voie de biosynthèse et de catabolisme des GAs chez les plantes supérieures. (*D'après Yamaguchi, 2008*)

Le départ de la voie de biosynthèse des GAs commence dans les plastes à partir du Géranyl Géranyl Di-Phosphate (GGDP) qui est converti en ent-kaurène grâce à l'ent-copalyl diphosphate synthase (CPS) et l'ent-kaurène synthase (KS). L'ent-kaurène passe ensuite dans la membrane du rediculum endoplasmique (RE). L'enzyme CYP701A ou ent-kaurène oxydase (KO) va produire l'acide ent-kaurénoïque et l'enzyme CYP88A ou l'acide ent-kaurénoïque oxydase (KAO) va produire la molécule de GA12. La GA12 passe alors dans le cytosol ou les GA20-oxydases et GA3-oxydases (GAox) vont produire les formes actives de gibbérelline (GA1 et GA4). Le catabolisme des GAs à lieu dans le cytoplasme et implique des GA2-oxydase, formant des GA inactives.

germination, les mécanismes induits lors de la première phase se poursuivent. La synthèse *de novo* de protéines est assurée grâce à la transcription de nouveaux ARN. Pour autant, ces ARN ne semblent pas spécifiques de la germination (Bewley et Marcus, 1990).

La germination est dépendante de facteurs environnementaux tels que la lumière, la température, et l'hygrométrie dont l'optimal varie sensiblement d'une espèce à l'autre. Ces paramètres permettent alors la synthèse et le catabolisme d'hormones impliquées dans le maintien ou la levée de dormance et l'achèvement de la germination.

- *La dormance des graines*

La dormance des graines est une caractéristique spécifique qui définit l'incapacité pour une graine d'effectuer l'intégralité des étapes de germination, alors que celle-ci est intacte et viable, malgré des conditions environnementales favorables (Finch-Savage and Leubner-Metzger, 2006). Ce processus correspond à une adaptation qui évite à la graine une germination précoce dans un environnement défavorable pour l'établissement d'une nouvelle génération de plantes, mais n'est pas une propriété obligatoire (Baskin et Baskin, 2004 ; Bewley and Black, 1994 ; Vleeshouwers et *al.*, 1995; Lang, 1996). Pour autant, il existe différentes dormances qui ont été classées en cinq types par Baskin et Baskin (1998, 2004) : physiologique, morphologique, morpho-physiologique, physique et combinée physiologique/physique. **La dormance physiologique** est la forme la plus répandue de dormance, existant chez la majorité des phanérogames. Elle concerne donc une grande partie des espèces cultivées et modèles comme *Arabidopsis thaliana*, ou *Medicago truncatula*.

Il s'agit d'une dormance liée à des facteurs endogènes à l'embryon (Dormance embryonnaire). Deux états de dormance physiologique peuvent également être distingués : **La dormance primaire (PD) et secondaire (PS)**. La première est une dormance présente à la récolte des graines. Elle est mise en place lors de la phase de maturation de la graine (Hilhorst, 1995; Kucera et *al.*, 2005). **La dormance secondaire**, intervient quand la dormance primaire est levée ou chez une graine non-dormante si les conditions environnementales nécessaires à la germination ne sont pas remplies. Il s'agit donc d'une dormance induite par les conditions du milieu : températures inadéquates, manque d'eau, graine enfouie trop profondément qui ne capte pas assez de lumière, teneur trop faible en O_2 (Hilhorst, 2007), etc.

Les facteurs de levée de dormance varient selon les espèces mais sont essentiellement des facteurs physiques tels que la stratification par le froid ou le chaud, la présence de lumière ou encore la post maturation à sec (after-ripenning), etc. Cependant, il existe également des

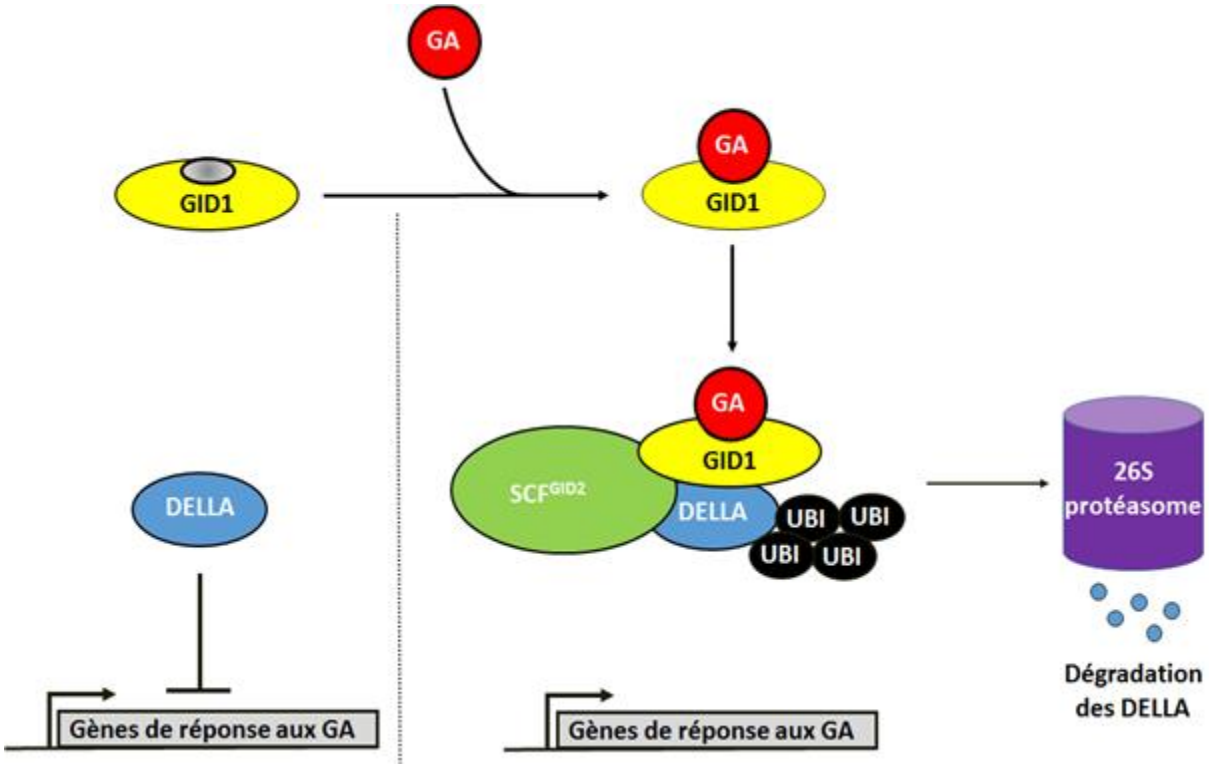


Fig. I.9 Schéma de la voie de transduction des GA.

En l'absence de GA, les récepteurs GID1 (GA INSENSITIVE DWARF1) sont inactifs permettant alors l'action inhibitrice des DELLA sur les gènes de réponse aux GA. En présence de GA, GID1 devient actif et est alors capable d'interagir avec des motifs spécifiques au niveau des protéines DELLA. Cela permet leur interaction avec le complexe SCF^{GID2} E3 ubiquitine. Les protéines DELLA sont alors ubiquitinées et adressées au protéasome 26s pour être dégradées. L'action inhibitrice des DELLA sur les gènes de réponses aux GA est alors levée.

SCF^{GID2} : complexe d'ubiquitination SKP1, Cullin, F-box GID2 ; UBI : ubiquitination

facteurs de levée de dormance de nature chimique tels que le nitrate, le NO, les ROS, ou les Karrikinolides (Bethke, et *al.*, 2004 ; 2006 ; Liu et *al.*, 2009, 2010 ; Waters et *al.*, 2012).

2.1 La régulation hormonale de la dormance et de la germination

La germination et les dormances associées sont des processus physiologiques contrôlés notamment par des hormones végétales avec en particulier un antagonisme gibbérellines (GA) acide abscissique (ABA).

- *Les gibbérellines*

Les gibbérellines (GA) regroupent une famille de plus de 130 diterpènes tetracycliques dont seul un petit nombre sont actifs en tant qu'hormones, les formes actives pouvant varier d'une espèce à l'autre (Thomas *et al.*, 2005). Les GAs sont formées à partir de l'ent-kaurène, lui-même formé à partir du géranylgéranyl diphosphate (GGDP). Leur teneur est régulée par un équilibre biosynthèse/catabolisme impliquant des GA-oxydases (Fig. I.8).

Les GA sont impliquées dans les processus de germination des graines de nombreuses espèces (Bentsink and Koornneef, 2002) et sont des agonistes de la germination. En effet, les mutants d'*A. thaliana* déficients dans la voie de biosynthèse des GA, notamment au niveau des *GA3ox1* et *Ga3ox2*, présentent une capacité germinative diminuée par rapport à celle du sauvage (Mitchum et *al.*, 2006). La biosynthèse de GA a lieu durant la phase d'imbibition, et des inhibiteurs de GA appliqués durant cette phase empêchent les graines de germer (Nambara et *al.*, 1991). L'anabolisme des GA est impliqué dans la germination des graines en réponse à la lumière, au froid ou après une post-maturation à sec (after-ripening). Ces facteurs induisent la synthèse de GA pendant les premières phases de la germination (Bentsink and Koornneef, 2002 ; Yamauchi et *al.*, 2004). Les GA interviennent d'au moins deux manières différentes lors de la germination. Elles permettent de stimuler la croissance de l'embryon (Karssen et *al.*, 1989), et d'induire l'expression des gènes liés à la dégradation de la paroi cellulaire afin de permettre la protrusion de la radicule (Koornneef et *al.*, 2002 ; Leubner-Metzger, 2002). Cependant, ces mécanismes ne sont pas nécessairement présents chez toutes les espèces et peuvent être induits de manières différentes. Chez *A. thaliana*, le phénomène d'affaiblissement de la paroi cellulaire n'a par exemple pas été observé, alors que celui-ci est présent chez la tomate et le tabac (Nonogaki and Morohashi, 1996 ; Debeaujon and Koornneef, 2000).

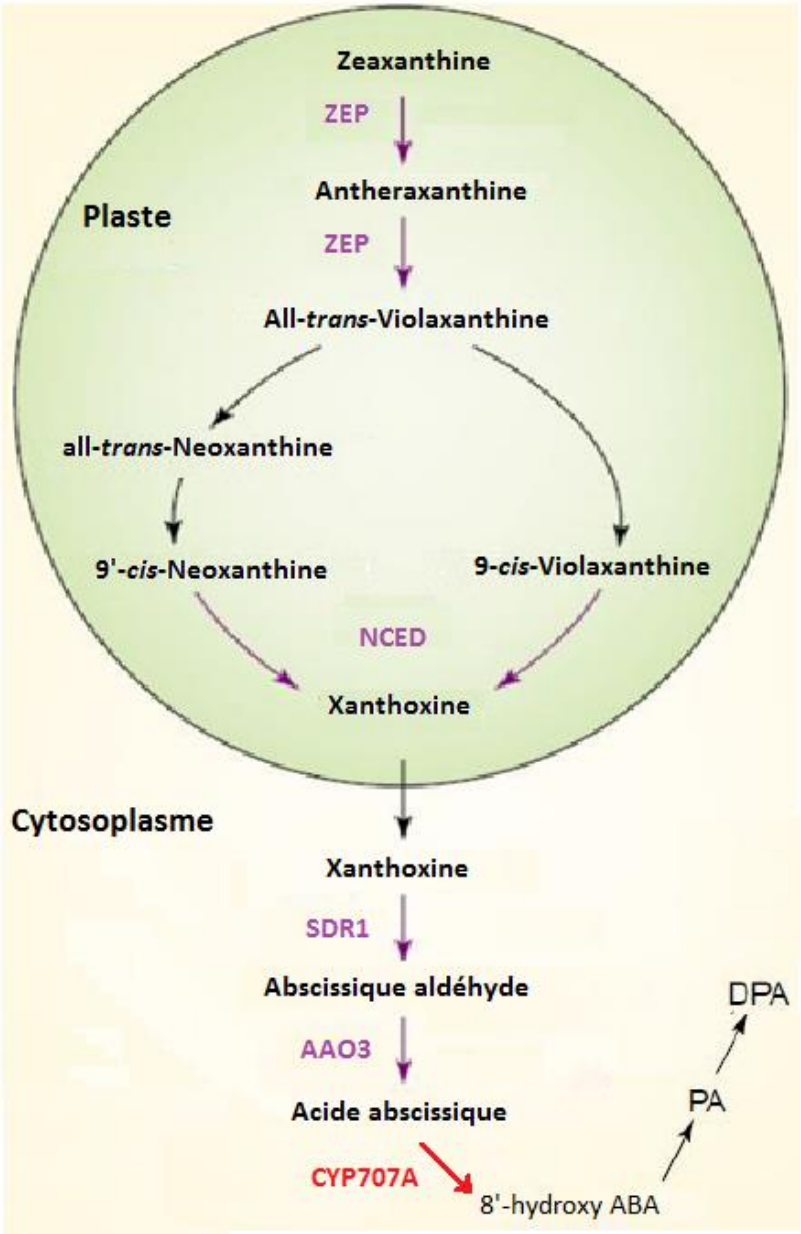


Fig. I.10 Voie de biosynthèse et de catabolisme de l'acide abscissique. (*D'après Nambara & Marion-Poll, 2003, 2005*)

La biosynthèse de l'acide abscissique se fait en deux étapes. La première étape se déroule dans les plastes où la zeaxanthine est convertie en *trans*-violanxanthine en deux temps par des zeaxanthine epoxide (ZEP). Celle-ci est convertie en xanthoxine par la nine-*cis*-epoxycaroténoïde (NCED) avant d'être exportée vers le cytosol pour la seconde étape ou elle sera convertie en abscissique aldéhyde par une déshydrogénase réductase (SDR1), lui-même oxydé en ABA par l'abscissique aldéhyde oxydase (AAO3)**.** L'ABA peut être hydroxylé par la CYP707A puis dégradé en acide phaséique (PA) et acide dihydro phaséique (DPA).

La réponse aux GA fait intervenir différents acteurs (Fig. I.9). Chez *A. thaliana*, le récepteur aux GA est une protéine de la famille des α/β hydrolases, GID1 (Ueguchi-Tanaka et *al.*, 2007). En présence de GA, GID1 est capable de recruter le complexe SCF^{GID2}-E3 ubiquitine ligase, renfermant la protéines GID2 à domaine F-box (McGinnis et *al.*, 2003 ; Gomi et *al.*, 2004). Ce complexe va alors ubiquitiner les protéines DELLA (nom du à la conservation d'un motif pentapeptide) et les adresser au protéasome 26S pour dégradation. Cette dégradation permet ensuite de lever l'action répressive des DELLA sur les gènes de réponse aux GA (Conaway et *al.*, 2002). Une de ces protéines DELLA (RGL2) est un régulateur négatif majeur des gènes de réponses aux GA spécifiquement impliqué dans la germination (Lee et *al.*, 2002 ; Tyler et *al.*, 2004).

- *L'acide abscissique*

L'ABA est une molécule à 15 carbones dérivée de la voie des caroténoïdes et dont l'enzyme clé de biosynthèse est la NCED (Nine-cis-epoxycarotenoid Dioxygenase). La première étape de la formation de l'ABA a lieu dans le chloroplaste où la NCED catalyse le clivage des cis-xanthophylles en xanthoxine (15 C), les étapes suivantes de la chaîne de biosynthèse ont lieu dans le cytosol (Nambara and Marion-Poll, 2003) (Fig. I.10).

L'ABA est un inducteur de dormance et un répresseur de la germination (Finch-Savage and Leubner-Metzger, 2006) antagoniste des GA et de leurs effets stimulateurs de croissance de l'embryon. L'induction et le maintien en dormance des graines sont alors lié à la teneur en acide abscissique de la graine (Finch-Savage and Leubner-Metzger 2006 ; Bentsink and Soppe 2008 ; Koornneef *et al.*, 2002). En effet, de nombreux mutants déficients dans la voie de synthèse ou de la transduction du signal ABA présentent une absence de dormance, notamment chez *A. thaliana* (Koornneef et *al.*, 1989 ; 2002 ; Meurs et *al.*, 1992 ; Parcy et *al.*, 1994 ; Raz et *al.*, 2001). L'ABA endogène produit par l'embryon au cours de la maturation de la graine induit la **dormance primaire** (Hilhorst, 1995; Kucera et *al.*, 2005), alors qu'une néo-synthèse d'ABA une fois la graine maturée induit une **dormance secondaire** (Hoang et *al.*, 2012).

L'action hormonale de l'ABA sur la dormance et la germination est contrôlée par un fin équilibre entre synthèse et catabolisme (Nambara and Marion-Poll, 2005). Le maintien en dormance des graines implique une synthèse d'ABA (Finkelstein et *al.*, 2008) alors qu'une post-maturation, une stratification ou d'autres mécanismes de levée de dormance entrainent une diminution de la sensibilité et/ou de la teneur en ABA (Gubler et *al.*, 2005). La levée de dormance passe alors majoritairement par l'inactivation de l'ABA via son hydroxylation en 8'hydroxy-ABA, spontanément isomérisé en acide phaséique (Kushiro et *al.*, 2004 ; Saito

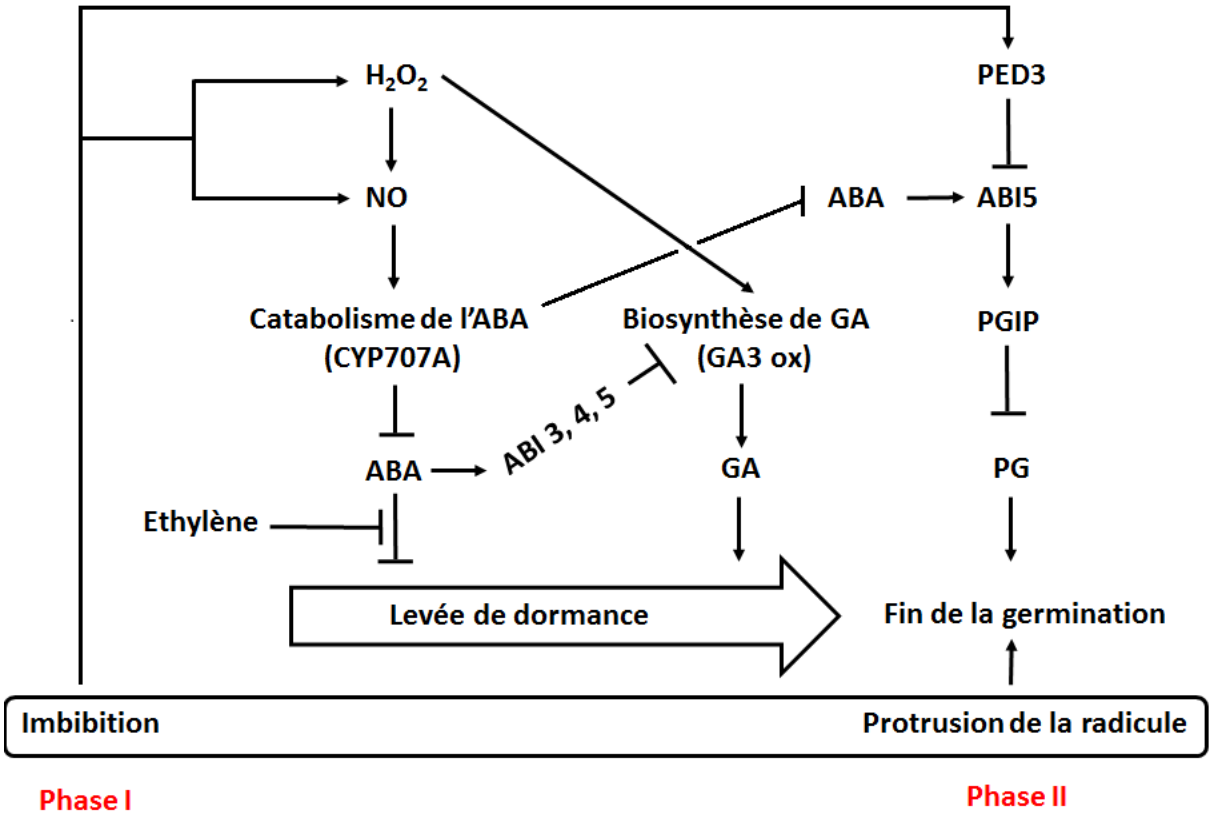


Fig. I.11 Modèle représentant comment l'H_2O_2, le NO, l'ABA, les GA et PED3 régulent la levée de dormance et la germination chez *A. thaliana.* (*D'après Kanai et al., 2010, Liu et al., 2010*)

L'imbibition des graines (Phase I) conduit à une production de NO et d'H_2O_2, provoquant la surexpression des gènes de catabolisme de l'ABA via le NO et des gènes de synthèse des GA via l'H_2O_2. La chute du pool d'ABA entraine alors une sous expression des facteurs de transcription ABI, qui eux même inhibent la synthèse des GA. La chute du pool d'ABA et l'augmentation du pool des GA permet alors la levée de dormance. Le gène PED3 induit après l'imbibition inhibe, de manière concomitante à la chute d'ABA, le facteur de transcription ABI5 qui surexprime la production d'inhibiteur de polygaracturonase. Une fois cette inhibition levée, les polygalacturonases deviennent alors active et permettent la protrusion de la radicule signant la fin de la germination (Phase II).

NO : monoxyde d'azote ; H_2O_2 : peroxyde d'hydrogène ; ABI : ABA insensitive ; PGIP : protéines inhibant les polygalacturonases ; PG : polygalacturonases ; PED3 : Peroxisome-defective loci 3

et *al.*, 2004 ; Okamoto et al., 2006 ; Nambara and Marion-Poll, 2005). La première hydroxylation est prise en charge par les ABA-8'hydroxylases codées par des gènes de la famille du cytochrome P450, les gènes *CYP707A* (Okamoto et *al.*, 2006) (Fig. I.10). Quatre gènes codants une activité CYP707A ont été mis en évidence chez *A. thaliana* (Kushiro et *al.*, 2004 ; Saito et *al.*, 2004). Parmi ces quatre gènes, *AtCYP707A2* a été montré comme étant surexprimé durant la phase d'imbibition et cette expression corrélée à une baisse du pool d'ABA endogène. Par ailleurs, chez le mutant *cyp707a2*, les graines présentent un phénotype hyper-dormant corrélé à des teneurs en ABA endogène six fois plus élevées que chez le sauvage (Kushiro et *al.*, 2004 ; Millar et *al.*, 2006).

Un certain nombre d'acteurs de la voie de perception-signalisation de l'ABA ont été identifiés. Il s'agit entre autres des facteurs de transcription ABI (ABA insensitive) et des éléments de réponse à l'ABA (ABRE, ABA Responsive Element) (Kanai et *al.*, 2010). Les facteurs de transcription ABI3, ABI4 et ABI5 agiraient dans un même réseau de régulation et exerceraient une action combinée sur les gènes exprimés dans la graine en réponse à l'ABA (Soderman et *al.*, 2000). En effet, les niveaux d'expression des gènes *ABI3* et *ABI5* sont corrélés au taux d'ABA présent dans les cellules et l'expression d'*ABI5* serait régulée par un certain nombre de gènes dont *ABI3* (Finkelstein et Lynch, 2000).

ABI5 code un facteur de transcription à domaine bZIP (basic leucine zipper) capable de se fixer à des motifs ABRE, présents dans la région promotrice de nombreux gènes régulés par l'ABA (Kanai et *al.*, 2010). Les gènes *PGIP*, codant des inhibiteurs de polygalacturonase, sont des gènes régulés par ABI5. En présence d'ABA et en réponse à ABI5, ces gènes présentent une surexpression et vont alors inactiver des polygalacturonases (PG), impliquées dans la rupture de l'albumen et la protrusion de la radicule, inhibant alors la germination. L'ensemble de ces réseaux de régulation permettrait donc le maintien en dormance des graines.

Chez d'*A. thaliana* le gène *PED3* (Peroxisome-defective loci3) est un transporteur de type ATP-biding cassette impliqué dans le transport des réserves lipidiques vers les peroxysomes au cours de la germination (Kanai et *al.*, 2011). Or, les mutants *ped3* sont largement affectés dans l'achèvement de leur germination, ce qui suggèrent l'implication de ce gène dans la régulation de la dormance et de la germination (Dave et *al.*, 2011). Alors que chez le mutant *ped3*, les taux d'*ABI5* sont très élevés et la germination compromise, le double mutant *ped3 abi5* présente un phénotype de germination identique au sauvage. Kanai et collaborateurs (2010) proposent alors que *PED3* aurait une action inhibitrice indirecte sur *ABI5*. Cette action inhibitrice sur *ABI5*, permettrait une diminution du taux des PGIP. Les polygalacturonases (PG) seraient alors

actives, permettant alors la rupture de l'albumen de la graine d'*A. thaliana* et donc la protrusion de la radicule (Fig. I.11).

- *Les autres hormones et molécules régulant la dormance et la germination*

D'autres hormones peuvent également être impliquées dans le processus de germination chez certaines espèces. Ainsi, l'éthylène est capable de promouvoir la levée de dormance et la germination par une action inhibitrice au niveau du signal ABA, notamment en réduisant la sensibilité à l'ABA (Kucera et *al.,* 2005 ; Finkelstein et *al.,* 2008). Cependant, l'éthylène n'impact pas la germination de l'orobanche (Zehar et *al.,* 2002). Chez le tabac, les brassinostéroides (BR) jouent également un rôle mineur par une action positive sur la germination d'une manière indépendante des GA (Leubner-Metzger, 2001). De manière exogène, les SL sont également capables de stimuler la germination des graines d'*A. thaliana* en dormance primaire, ou en thermo-inhibition. (Nelson et *al.,* 2009 ; Toh et *al.,* 2012).

D'autres composés, comme les strigolactones-likes (karrikinolides) (Waters et *al.,* 2012), ainsi que les espèces réactives d'oxygène (ROS) peuvent également stimuler la germination. Parmi ceux-ci, chez *A. thaliana*, les nitrates, l'oxyde nitrique et le peroxyde d'hydrogène, sont impliqués dans le processus de levée de dormance et la germination en induisant le catabolisme de l'ABA (Bethke et *al.,* 2004, 2006 ; Liu et *al.,* 2009, 2010). Le NO et l'H_2O_2 exogène induisent la surexpression des gènes *AtCYP707A2* et *AtGA3ox1* dès l'imbibition des graines (Bethke, et *al.,* 2004 ; 2006 ; Liu et *al.,* 2009, 2010).

L'état de dormance correspond donc à un trait évolutif permettant la germination des graines uniquement dans un environnement favorable à l'établissement d'une nouvelle génération d'individu. Elle est induite par l'acide abscissique, une phytohormone antagoniste de la germination, au cours la maturation de la graine sur la plante mère ou suite à une néo-synthèse d'ABA en conditions environnementales défavorables à la germination. La germination des graines en dormance est alors précédée par une chute du pool endogène en ABA, essentiellement par catabolisme *via* les 8'ABA-hydroxylases.

Les gibbérellines, une classe de phytohormones agonistes de la germination, sont également impliquées dans les phénomènes de dormance et de germination. L'équilibre hormonal entre l'ABA et les GA agit alors comme un intégrateur de signaux environnementaux afin de maintenir l'état de dormance ou d'induire la germination. Le degré de dormance dépend alors du ratio ABA/GA, et de l'évolution de la sensibilité à ces deux hormones (Wareing and Saunders, 1971). Ainsi, alors qu'un ratio ABA/GA fort permet de maintenir les graines en

dormance, un faible ratio permet au contraire la levée de dormance et la germination (Rodriguez-Garcio et *al.,* 2009 ; Hoang et *al.,* 2012).

2.2. La germination de l'orobanche : une germination sous contrôle de l'hôte

La germination des orobanches présente des particularités liées à son mode de vie parasitaire. Chez l'orobanche rameuse (*P. ramosa* L. pomel), deux étapes vont se succéder pour permettre la germination, la période de conditionnement et l'étape de stimulation.

- *La période de conditionnement* : une *levée partielle de la dormance primaire sous contrôle abiotique.*

La période de conditionnement est décrit comme une période nécessaire et bénéfique aux graines permettant la modification du niveau de dormance et l'acquisition de la sensibilité aux stimulants de germination (Pieterse 1979 ; Joel et *al.,* 1991). Elle est divisée en deux étapes, le conditionnement à sec et le conditionnement humide.

À la suite de leur dissémination, les graines matures de *P. ramosa* ne sont que partiellement dessiquées (Pieterse and Verkleij 1994). Ces graines sont inaptes à germer en réponse à un stimulant dans des conditions environnementales favorables, elles sont donc dans un état dormance primaire. Elles nécessitent alors un stockage à sec (conditionnement à sec) pouvant demander de quelques mois à plus de deux ans dans des conditions naturelles (Edwards 1972, Saghir 1986). Le facteur clé de cette étape de levée de dormance est le taux d'humidité des graines qui doit atteindre une valeur entre 5 et 18%, avant d'être considérée comme achevée (Bazin et *al.,* 2011). Cependant, une fois les graines post maturées, celles-ci ne sont pour autant pas aptes à germer en réponse à un stimulant après imbibition. Cette levée de dormance n'est donc que partielle (Probert 2000).

Une fois l'étape de post maturation achevée, les graines nécessitent une phase de conditionnement humide, plus communément appelé conditionnement. Au cours de cette étape, les graines acquièrent la capacité à germer en réponse à un stimulant, elles sont alors considérées comme conditionnés (Pieterse, 1979). Cette étape permet de diminuer encore la dormance primaire et d'acquérir la sensibilité aux stimulants de germination (Joel et *al.,* 1991 ; Matusova et *al.,* 2004 ; Murdoch et Ellis, 2000). L'étape de conditionnement humide des orobanches peut alors être comparée à l'étape de stratification chez les graines de plantes non parasites. Chez les *Orobanchaceae,* la durée du conditionnement humide est influencée par la température. Elle peut s'étaler de 1 à 14 jours, avec des températures allant de 10 à 35 °C pour

S. hermonthica (Murdoch and krebab, 2013). De manière générale, un temps de conditionnement humide de 7 jours à 21°C permet à la majorité des graines d'*Orobanche* et de *Striga* de passer de cet état non conditionné à l'état conditionné.

Le conditionnement commence avec l'imbibition des graines, processus physique obtenu après la première journée de conditionnement et suivi par la mise en place de différents évènements métaboliques. Chez *P. aegyptiaca*, une augmentation progressive de l'activité respiratoire, une forte reprise de la synthèse protéique et une utilisation des sucres réducteurs sont observées. La reprise de respiration est suivie d'un pic respiratoire après trois jours de conditionnement, avant de décroître graduellement jusqu'à de faibles niveaux (Bar-Nun and Mayer, 1993). Une forte reprise de la transcription (Joel et *al.*, 2006) ainsi qu'une accumulation d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) est également détectée (Uematsu et *al.*, 2007).

Les processus sous-jacents régulant l'étape conditionnement ne sont pas encore déterminés à ce jour. Différentes observations suggèrent néanmoins une implication des gibbérellines dans le déroulement de cette étape dans les graines de *O. minor* et *P. ramosa* (Joel et *al.*, 2011 ; Song et *al.*, 2005 ; Uematsu et *al.*, 2007). Par ailleurs, l'application exogène de GA3 durant le conditionnement augmente le taux de germination des graines après stimulations, tandis que l'application d'inhibiteur de la biosynthèse des GA provoque l'effet inverse chez *P. ramosa*, *P. aegyptiaca* et *O. minor* (Song et *al.*, 2005). En parallèle, chez *O. minor* la concentration en ABA des graines décroît sensiblement au cours du conditionnement par un phénomène de diffusion dans le milieu, et non par catabolisme, (Chae et *al.*, 2004). La balance ABA/GA semble donc être modifiée au cours du conditionnement, sans pour autant aboutir à l'achèvement de la germination. Fait intéressant, l'état conditionné peut être maintenu plus de 30 jours à 21°C (Gibot -Leclerc et *al.*, 2004). Après ce délai, les graines perdent la capacité à répondre aux stimulants (Kebreab and Murdoch, 1999). Il s'agit d'un phénomène réversible nécessitant un nouveau passage à l'état sec suivi d'une phase humide. Après ces étapes, les graines nécessitent obligatoirement une étape de stimulation pour achever leur germination.

- *L'étape de stimulation : une levée de dormance sous contrôle biotique*

Suite à l'étape de conditionnement, les graines d'orobanche deviennent aptes à percevoir les stimulants de germination exsudés par la plante hôte. Pour autant, sans leur perception les graines conditionnées ne germent pas. Elles sont donc toujours dans un état de dormance.
À ce jour, presque rien n'est connu quant aux mécanismes sous-jacents impliqués dans l'étape de stimulation. La seule analyse systématique des profils hormonaux dans les graines de plantes

parasites a été effectuée chez *Striga hermonthica*, et montre qu'une accumulation de certaines hormones et la diminution de l'ABA sont impliquées dans la germination des graines (Toh et *al.,* 2012). En outre, l'application d'inhibiteurs de la biosynthèse des GA (Ancymidol, Uniconazole et le Paclobutrazol) lors de la stimulation inhibe la germination de *P. ramosa, P. egyptiaca* et *O. minor*. Par ailleurs, l'application exogène d'ABA inhibe la germination des graines de *P. ramosa* (Zehhar et *al.,* 2002). Ces résultats suggèrent que les graines d'orobanche nécessitent une teneur en ABA suffisamment faible, ainsi qu'une biosynthèse de GA pour germer en réponse aux stimulants de germination.

La germination des graines d'orobanche suivant la perception des stimulants de germination est soumise à des conditions particulières, variables en fonction des espèces et au sein d'une espèce. Ainsi, la germination s'achève par la protrusion de la radicule après 3 à 10 jours post stimulation, avec des températures allant de 15 à 30°C, pour *P. ramosa* et *O. cernua*.

La levée de dormance et la germination de l'orobanche sont donc particulières, elle implique trois niveaux de levée de dormance successifs. Une première levée partielle liée à la dessiccation des graines, une seconde levée partielle liée au conditionnement humide, et la levée de dormance liée à la perception du stimulant de germination. En effet, sans stimulant de germination, la graine est incapable de germer mais présente les signes d'accomplissement de la phase I et d'entrée en phase II. Suite à la perception des stimulants de germination, la germination prend fin au bout de quelques jours par la protrusion de la radicule (Fig. I.12).

2.3. Les stimulants de germination : un signal chimique perçu par les plantes parasites

C'est en 1966 qu'un stimulant de germination a été caractérisé pour la première fois. Ce stimulant exsudé par le système racinaire de Cotonnier (*Gossypium hirsutum*, plante non hôte), capable de stimuler la germination des graines de *Striga*, fut nommé strigol (Cook et *al.,* 1966). Depuis, de nombreux autres stimulants de germination ont été découverts, comme l'orobanchol stimulant la germination d'*O. minor* issu du trèfle rouge (*Trifolium pratense*), ou bien synthétisé comme le GR24. La grande majorité des stimulants de germination découverts à ce jour appartiennent à la famille des SL (Xie et *al.,* 2010). Les SL présentent quatre cycles : A, B, C et D (Bowmeester et *al.,* 2003 ; Yoneyama et *al.,* 2010). Alors que les cycles A et B présentent de nombreuses variations entre les différentes molécules, le cycle C, le cycle buténolide D et le lien énol-éther sont eux très conservés (Fig. I.14).

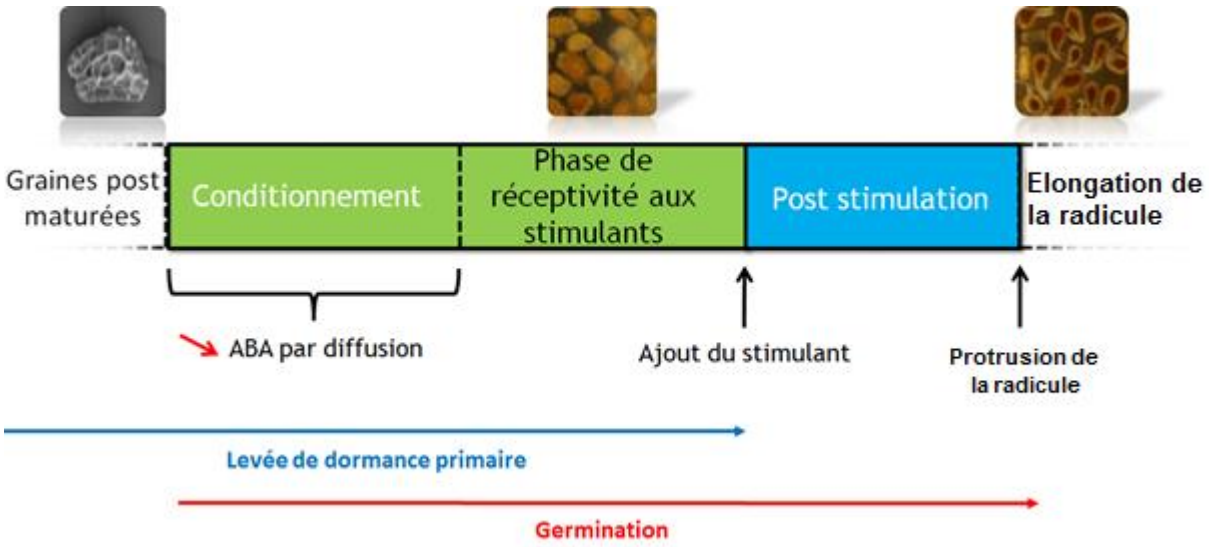


Fig. I.12 Schéma des étapes de germination des graines d'orobanche à germination stimulant dépendante.

Les stimulants de germination apparentés aux SL et conservant le cycle buténolide D plus ou moins modifié, sont appelés stigolactone-like (Evidente et *al.*, 2009) (Fig. I.15). Leur activité est généralement plus faible ou plus spécifique que celle des SL. Par exemple, le dehydrocostus lactone (DCL) ou les guaianolides lactone (GLs) synthétisés par le tournesol (*Helianthus annuus*) stimulent surtout la germination de *O. cumana*, uniquement rencontrée sur celui-ci (Labrousse et *al.*, 2001 ; Matusova et *al.*, 2005 ; Pérez de Luque et *al.*, 2000). Deux autres SL-like, le peagol et le Peagoldione, présents chez le pois (*Pisum sativum*) stimulent la germination à forte concentration (>10^{-4} M) d'*O. foetida* et *P. aegyptiaca* respectivement (Evidente et *al.*, 2009). Les karrikinolides, produits dans les fumées issues de la combustion de matériel végétal, possèdent également un cycle buténolide (Flematti et *al.*, 2004). Ils sont capable de stimuler la germination à forte concentration (>10^{-5}M) de *P. ramosa* et *P. aegyptiaca*, mais inhibent l'élongation de la radicule (Bar Nun & Mayer, 2005 ; Daws et *al.*, 2008).

Des analogues de SL, comme le GR24, ont été synthétisés, ils ont permis de confirmer l'importance du cycle D et du pont enol-éther dans l'activité stimulante de la germination (Mangnus and Zwanenburg 1992). Les analogues de synthèse les plus actifs et les SL (Fig. I.13, 14) sont capables d'induire la germination des graines des plantes parasites jusqu'à des concentrations extrêmement faibles (10^{-12} M avec du GR24 chez *P. ramosa*). Des molécules sans aucune similarité de structure avec les SL, appelées stimulants non-strigolactone, ont également été identifiées (Fig. I.15). C'est le cas des isothiocyanates (ITC) retrouvés dans la rhizosphère des Brassicaceae, telle que le colza (*Brassica napus*, hôte de *P. ramosa*) ou *Arabidopsis*, qui sont capables d'induire la germination de certaines orobanches. Il a ainsi été mis en évidence que *P. ramosa* germait en réponse aux ITC, et plus spécifiquement en réponse au 2-phenylethyl-isothiocyante (2PEITC) (Auger et *al.*, 2012). La vesce commune (*Vicia sativa*), exsude elle du soyasapogenol B, capable d'induire spécifiquement la germination d'*O. minor*. (Evidente et *al.*, 2011). Outre les molécules issues des plantes, certains micro-organismes sont également capables de produire des molécules stimulant la germination des orobanches. Des molécules issues de micro-organismes dont la cotylenine A et la fusicoccine A, respectivement produites par *Cladosporium spp.* et *Fusicoccum amygdali* sont capables d'induire la germination d'orobanches (Yoneyama et *al.*, 1998 ; Evidente et *al.*, 2006).

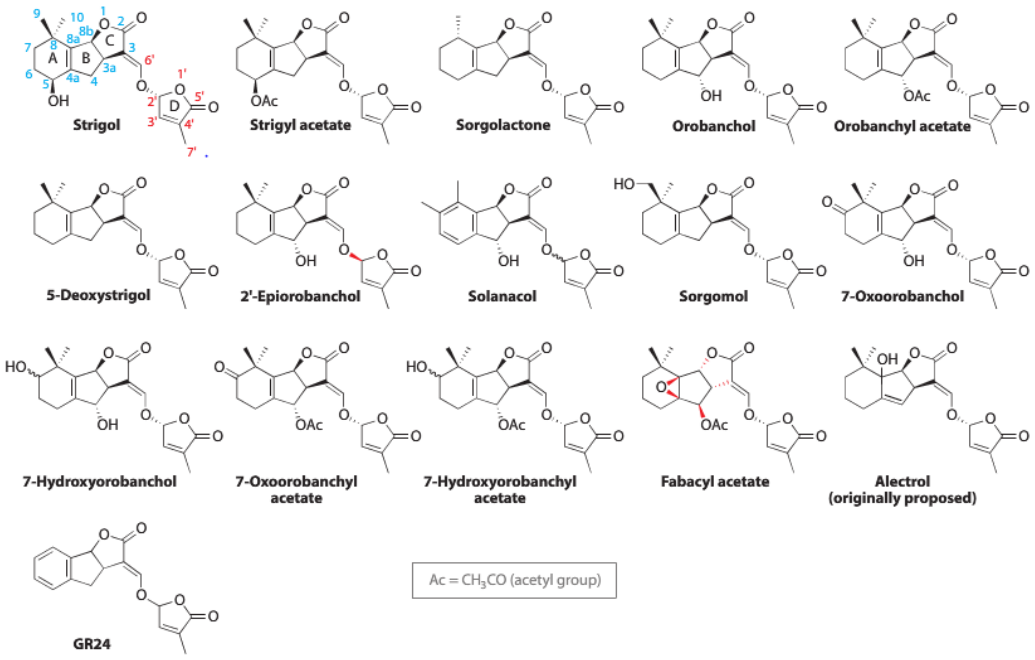


Fig. I.13 Structures développée des strigolactones naturels et du strigolactone synthétique (GR24), induisant la germination des graines d'orobanche. (*Xie et al., 2010*)

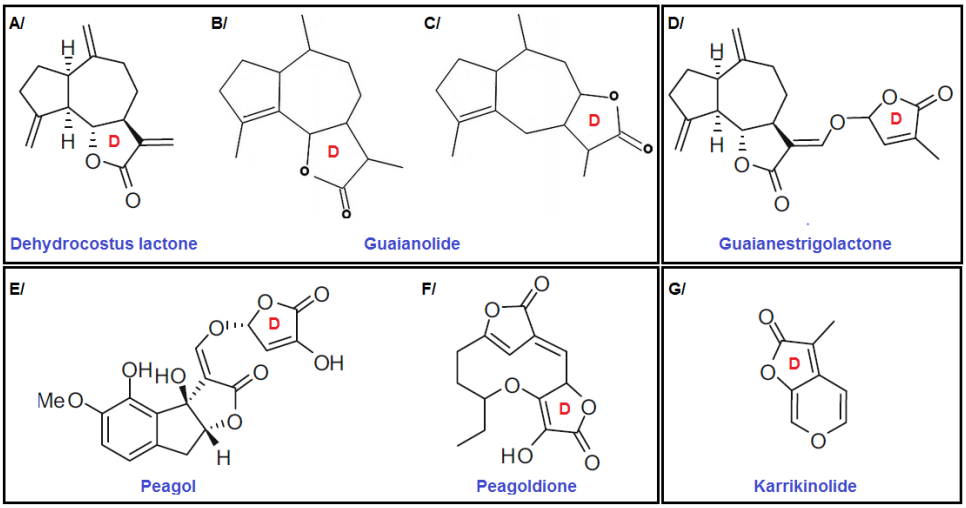


Fig. I.14 Stimulants de germination de type Strigolactone-like.

A/ Dehydrocostus Lactone ; **B/** et **C/** Guaianolide sesquiterpène lactone ; **D/**Guaianestrigolactone ; **E/** Peagol ; **F/** Peagoldione ; **G/** Karrikinolide.

- A/, B/ et C/ Issus des exsudats racinaires de tournesol, D/ molécule synthétique dérivant de C/.
- E/ et F/ Issus des exsudats racinaires de pois
- G/ Issu des fumées de combustion de matériel végétal

Toutes les molécules possèdent le cycle buténolide D.

3. La voie de biosynthèse et de signalisation des strigolactones

Les SL sont aujourd'hui considérés comme une classe de phytohormones, impliquée dans de nombreux processus physiologiques. Au sein de la plante, les SL participent au contrôle de la ramification des tiges en inhibant le débourrement des bourgeons axillaires, et en agissant comme messager secondaire de l'auxine dans le maintien de la dominance apicale (Gomez-Roldan et *al.,* 2008 ; Umehara et *al.,* 2008). Ils sont également impliqués dans l'architecture racinaire (Ruyter-Spira et *al.,* 2011), en inhibant le développement des racines adventives (Rasmussen et *al.,* 2012). Outre l'implication des SL dans le contrôle du développement aérien et racinaire, plusieurs études ont montré leur implication, ainsi que celles des SL-like et notamment les karrikinolides, dans le processus de germination d'*A. thaliana* (Tsuchiya et *al.,* 2010 ; Toh et *al.,* 2012, Nelson et *al.,* 2009, 2011).

3.1. La voie de biosynthèse des strigolactones

Les SL sont des métabolites appartenant aux apocaroténoïdes, c'est-à-dire issus de la dégradation de caroténoïdes En effet, leur production est inhibée après application de fluoridone, un inhibiteur de la biosynthèse des caroténoïdes (Matusova et *al.,* 2005). Quatre enzymes ont été identifiées à l'aide de mutants, qui peuvent être complémentés par l'apport de SL exogène. La première étape de biosynthèse des SL (Alder et *al.,* 2012) est catalysée par la β-carotène isomérase D27, identifiée chez le riz. Elle permet la conversion des *trans*-β- carotène en 9-*cis*-β-carotène (Lin et *al.,* 2009). Le 9-*cis*-β-carotène est ensuite converti en 10'-*apo*-β-caroténal plus β-ionone par l'action de l'enzyme Carotenoid Clivage Dioxygenase 7 (CCD7) (Fig. I.16). Il s'ensuit une seconde opération de clivage réalisé par CCD8 catalysant la conversion du 10'-*apo*-β-caroténal en carlactone (Gomez-Roland et *al.,* 2008 ; Umehara et *al.,* 2008 ; Alder et *al.,* 2012). Le carlactone présente déjà le cycle D et le pont énol-éther caractéristiques des SL. Ceci suggère qu'il puisse être converti en 5-deoxystrigol et ses stéréo-isomères, par l'action d'un certain nombre d'oxydations potentiellement catalysées par MAX1 (Kohlen et *al.,* 2011 ; Booker et *al.,* 2005; Stirnberg et *al.,* 2002 ; Gomez-Roldan et *al.,* 2008 ; Umehara et *al.,* 2008). La conversion du carlactone en SL *in planta* reste donc encore à élucider (Ruyter-Spira et *al.,* 2013). De manière putative, il est également supposé que les autres SL (Orobanchol, Orobanchyl acetate, deoxystrigol,…) dérivent du 5-deoxystrigol par diverses réactions encore indéterminées (Ruyter-Spira et *al.,* 2013).

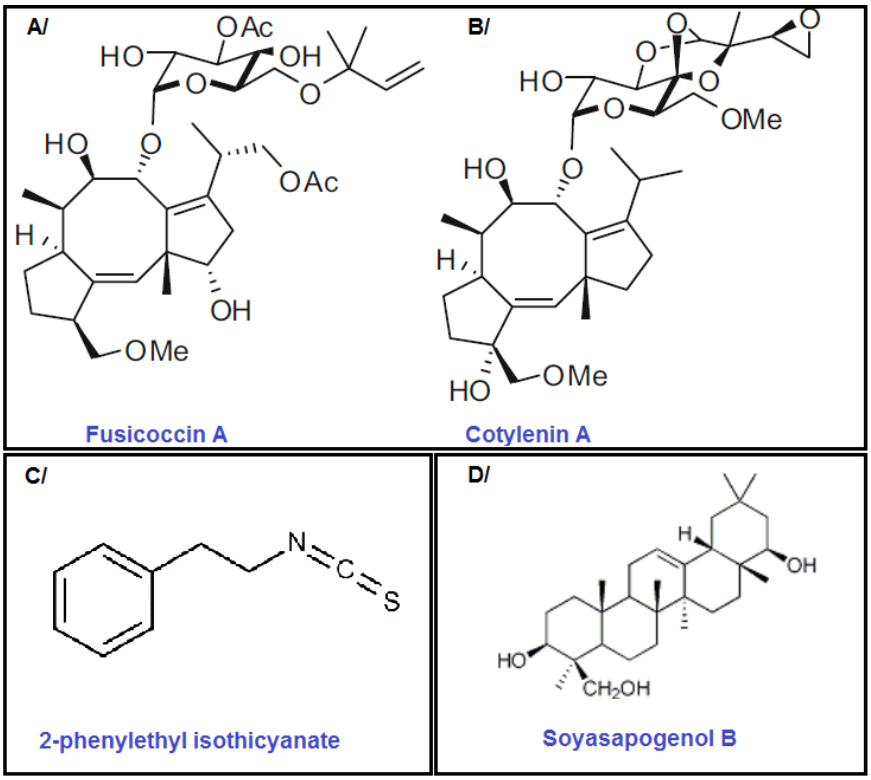


Fig. I.15 Stimulants de germination de type non-strigolactone.

A/ Fusicoccin A ; **B/** Cotylenin A ; **C**/2-phenylethyl isothiocyanate ; **D/** Soyasapogenol B

- A/ et B/ Issus de micro-organismes, *Fusicoccum amygdali* et *Cladosporium spp.* respectivement
- C/ Issu de la rhizosphère du colza
- D/ Issu des exsudats racinaires de la vesce commune

Aucune de ces molécules ne portent les cycles caractéristiques des SL.

3.2 La voie de signalisation des strigolactones

Depuis plusieurs années, la voie de perception et de transduction des SL est explorée afin de comprendre leur mode d'action dans les divers processus auxquels ils participent. Celle-ci est en cours d'identification et un modèle, encore parcellaire, a été proposé (Fig. I.17). Les différents acteurs impliqués dans la signalisation de cette phytohormone ont été mis en évidence à partir de phénotype particuliers associés à des mutants insensibles à l'apport de SL exogène, tels que RMS (Ramosus), MAX (More Axillary growth), ou encore DAD (Decreased apical dominance).

- *Récepteurs putatifs et réponses différentielles entre strigolactones et karrikines: Le rôle des protéines α/β hydrolases*

Plusieurs mutants insensibles aux SL se sont avérés être affectés au niveau au niveau de protéines α/β hydrolases (Arite et *al.,* 2009). Il s'agit d'une part des mutants hyper-ramifiés, les mutants *d14* d'*A.thaliana* et d'*O. sativa*, et *dad2* de *P. hybrida* (*D14* et *DAD2* étant des orthologues ; Hamiaux et *al.,* 2012), et d'autre part des mutants insensibles aux SL et aux karrikines lors de la germination, les mutants *kai2* d'*A. thaliana* (*KAI2* étant un paralogue de *D14* ; Waters et *al.,* 2012).

Dans les processus de ramifications des tiges, le mutant *d14* d'*A.thaliana* présente un phénotype hyper-ramifié et est insensibles aux SL exogènes. Par ailleurs, chez *P. hybrida* la protéine DAD2 est capable de fixer et d'hydrolyser le GR24, ce qui libère les cycles ABC incapable d'interagir avec DAD2 (Hamiaux et *al.,* 2012 ; Jiang et *al.,* 2013 ; Nakamura et *al.,* 2013 ; Zhou et *al.,* 2013). La protéine D14/DAD2 est donc un composant essentiel du signal SL dans ce processus.

Au cours de la germination, les SL et les karrikines peuvent promouvoir la germination d'*A. thaliana* dans des conditions particulières. Dans ces conditions, les mutants *kai2* montrent une insensibilité aux karrikines et aux SL, alors que les mutants *d14* ne présentent aucun phénotype particulier. L'α/β hydrolase KAI2 est donc celle impliquée majoritairement dans la perception des SL au cours de la germination d'*A. thaliana* (Waters et *al.,* 2012) (Fig. I.17).

Les α/β hydrolases KAI2 et D14/DAD2 sont donc impliquées dans la perception des SL à des stades de développement différents, germination et stade plus tardif respectivement (Waters et *al.,* 2012 ; Nelson et *al.,* 2011, Tsuchiya et *al.,* 2010). Par ailleurs, alors que D14 est spécifique des SL, KAI2 présente une forte affinité aux karrikines tout en pouvant également

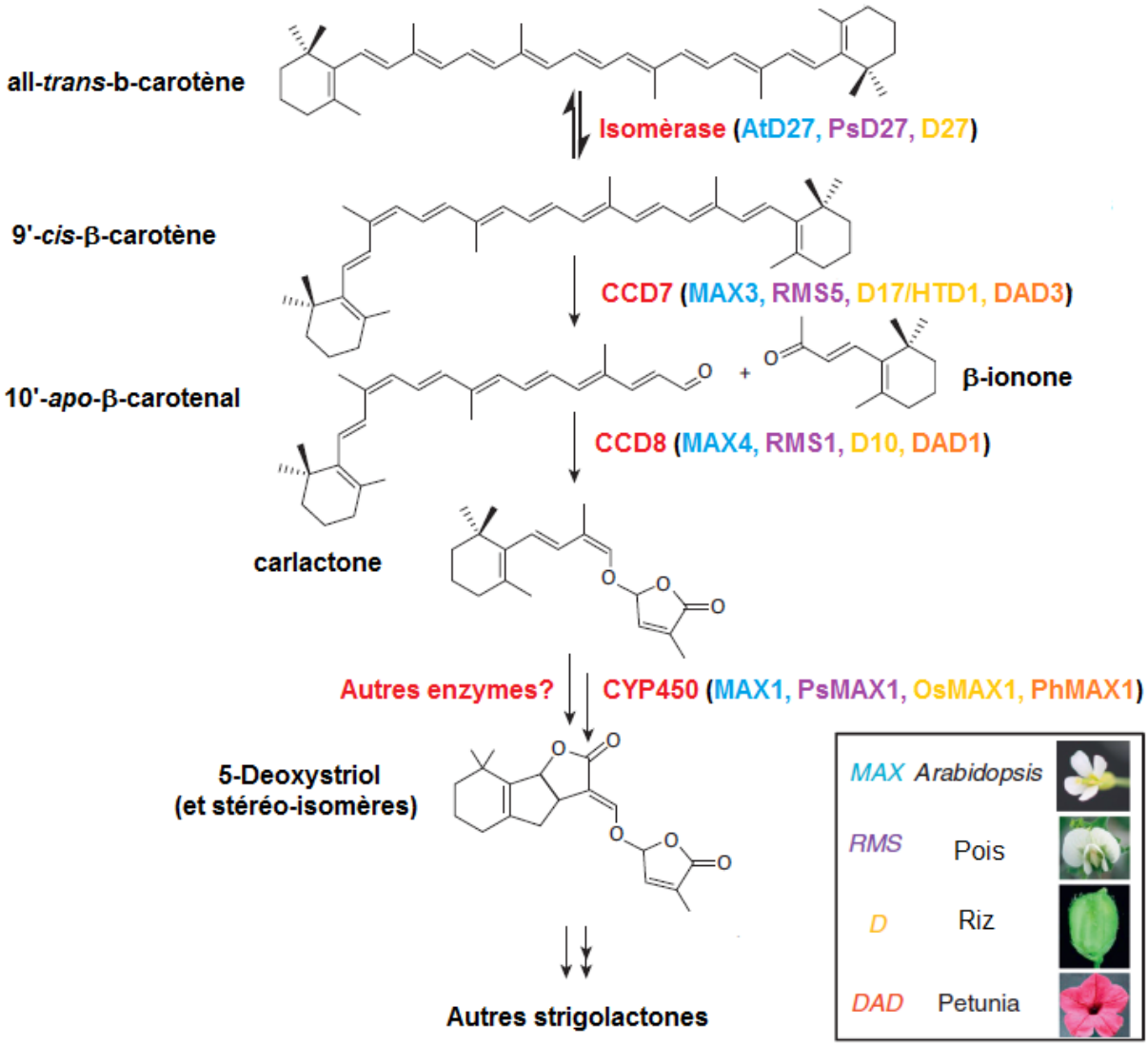


Fig. I.16 Voie de synthèse putative du 5-Doxystrigol et des autres strigolactones dérivés, à partir des *trans*-β-carotène. (*D'après Ruyter-Spira et al., 2013 ; de Saint Germain et al., 2013*)

Les SL dérivent de la voie des caroténoïdes. Les premières étapes de biosynthèse se déroulent dans les plastes, ou les all-*trans*-β-carotène sont converti en carlactone par les réactions catalysées par la β-carotène isomérase D27, puis par les Carotenoid Clivage Dioxygenase 7 et 8 (CCD7 et CCD8). De manière putative, le carlactone serait ensuite converti en 5-deoxystrigol dans le cytoplasme sous l'action de MAX1. Les autres SL dériveraient ensuite du 5-deoxystrigol.

fixer les SL avec une plus faible affinité (Waters et *al.*, 2012). En effet, alors que les SL et les karrikines stimulent la germination d'*A. thaliana*, impliquant l'α/β hydrolase KAI2, seuls les SL influencent d'autres types d'événement comme la ramification des tiges, impliquant l'α/β hydrolase D14/DAD2 (Umehara et *al.*, 2008 ; Ruyter-Spira et *al.*, 2011).

- *MAX2/D3/RMS4, une protéine à domaine F-box : un élément clé de la transduction du signal strigolactone*

Les mutants *max2 d'A. thaliana* (orthologue de D3 –Dwarf– chez *O. sativa*, et de RMS4 chez *P. sativum*) sont insensibles à la fois aux SL et aux Karrikines, quel que soit le stade de développement, germination comprise. MAX2/D3/RMS4 est donc essentielle et commune aux réponses aux SL et aux Karrikines (Toh *et al.*, 2012 ; Nelson *et al.*, 2011). Cette protéine possède un domaine F-box, elle est une sous-unité variable du complexe SCF dont la fonction est de recruter les substrats à ubiquitiner.

Chez *P. hybrida* et *O. sativa*, suite à l'interaction avec le GR24, les α/β hydrolases correspondantes, DAD2 et D14, changent de conformation et deviennent capables d'interagir avec MAX2 ou D3 respectivement (Hamiaux et *al.*, 2012 ; Nakamura et *al.*, 2013 ; Zhou et *al.*, 2013). Fait intéressant, chez *Striga hermonthica* le gène *MAX2* est fortement exprimé durant la période de conditionnement, au cours de l'acquisition de la sensibilité aux stimulants. De plus, chez les mutants *Atmax2* insensibles aux SL, la complémentation par *ShMAX2* permet de restaurer en grande partie le phénotype sauvage, suggérant l'implication de cette protéine dans le processus de germination en réponses aux SL des plantes parasites (Liu et *al.*, 2014).

- *Implication du SCF^{MAX2}-E3 dans la signalisation strigolactone*

Après perception des SL, D14/DAD2 change de conformation, ce qui lui permet alors de se lier à MAX2 (Hamiaux et *al.*, 2012 ; Nakamura et *al.*, 2013). MAX2/D3 est alors capable de reconnaître le complexe SKP1-CULLIN, par son domaine F-box, pour former le complexe SCF^{MAX2} ubiquitine ligase E3 (SCF^{MAX2}-E3) (Waldie et *al.*, 2014 ; Zheng et *al.*, 2014 ; Stirnberg et *al.*, 2007 ; Jiang et *al.*, 2013 ; Zhou et *al.*, 2013). Les complexes SCF-F-box-E3 vont alors aller ubiquitiner des protéines cibles afin de les adresser au protéasome 26S pour dégradation (Waldie et *al.*, 2014).

À ce jour, plusieurs protéines cibles du complexe SCF^{MAX2}-E3 de la voie de signalisation des SL ont été identifiées dans les processus de ramification des tiges (Fig. I.18).

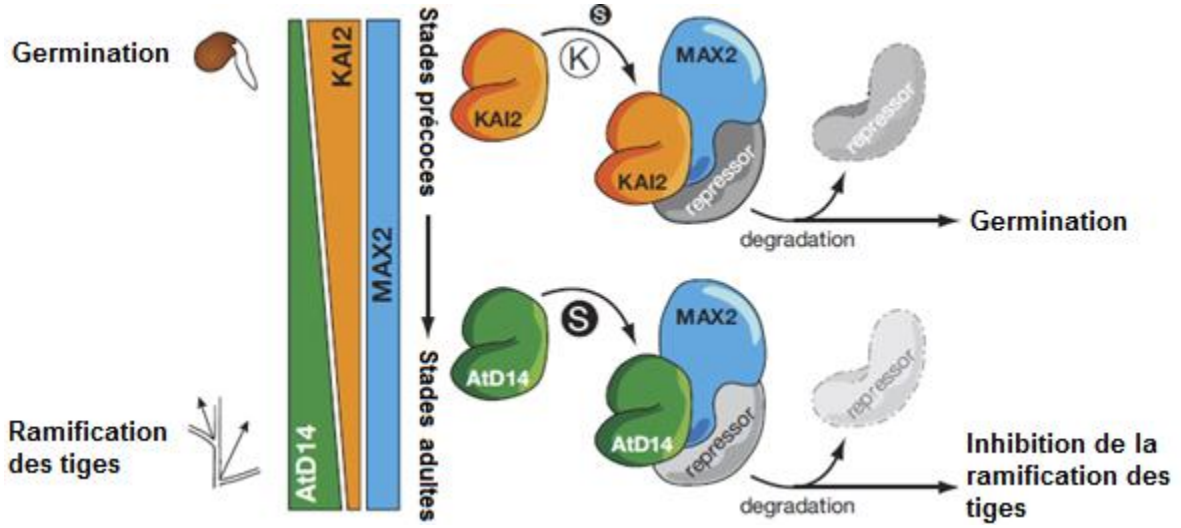


Fig. I.17 Modèle de discrimination du signal buténolide et strigolactone par KAI2, AtD14 et MAX2 au cours du développement de la plante. (*Waters et al., 2012*)

Les niveaux d'expression relatifs de *AtD14* et *KAI2* varient au cours des différents stades de développement, chaque protéine influence ainsi différents processus. Pendant la germination des graines et l'établissement des plantules, *KAI2* et la signalisation liée aux karrikines (k) jouent un rôle dominant, mais dans le développement végétatif plus tardif *AtD14* et la signalisation SL (S) prévalent. Au contraire, *MAX2* maintient un profil identique au cours du développement. MAX2, un composant F-box du complexe ubiquitine ligase SCF^{MAX2}-E3, est supposé pour dégrader diverses protéines répresseurs qui suppriment des réponses aux karrikines ou aux SL. KAI2 et AtD14 sont des modulateurs potentiels de l'activité de MAX2, et sont présentés dans ce modèle comme les récepteurs respectifs des karrikines et des SL.

La protéine D53 identifié chez *O. sativa* est une protéine de la sous famille des D53-Like aussi connus sous le nom des SUPPRESSOR OF MORE AXILLARY GROWTH2 1-LIKE (SMXL) chez *A. thaliana* (Stanga et *al.,* 2013). La protéine D53 est capable d'interaction avec des protéines TOPLESS, elles-mêmes connues pour être des co-répresseurs de la transcription dans diverses voies de signalisation hormonale (Szemenyei et *al.,* 2008 ; Causier et *al.,* 2012 ; Long et *al.,* 2006). Chez le riz, il existe au moins trois protéines TOPLESS RELATED PROTEIN (TPR) : TPR1, 2 et 3. TPR2 a été caractérisée comme étant impliquée, entre autres, dans l'architecture du système aérien. Jiang et collaborateurs (2013) ont montré qu'il existait une interaction entre D53 et TRP2, suggérant que les protéines TRP peuvent être des régulateurs impliqués dans la partie en aval de la signalisation SL. En absence de SL, D53 forme un complexe avec des TPL/TPR qui réprime des facteurs de transcription impliqués dans la signalisation SL. L'inhibition de ces facteurs de transcription va alors inhiber la transcription des gènes de régulation de la ramification, aboutissant au phénotype hyper-ramifié (Zheng et al., 2014). En présence de SL, la reconnaissance de D53 par le complexe SCF^{MAX2}-E3 induit son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome, levant alors son action inhibitrice sur la régulation de la ramification (Jiang et *al.,* 2013 ; Zheng et *al.,* 2014, Waldie et *al.,* 2013). Fait intéressant, D53 n'est recruté ni en présence de Karrikines, ni en présence des cycles ABC ou D des SL (Jiang et *al.,* 2013).

Chez *A. thaliana,* SMAX1 (homologue de D53 chez *O. sativa* ; Zhou *et al., 2013*), est impliqué dans la germination des graines. En effet, le phénotype du mutant *max2,* insensible aux karrikines et aux SL durant la germination, est complétement restauré chez le double mutant *max2*/*smax1* (Stanga et *al.,* 2013). Cependant, chez ce double mutant, le phénotype sauvage n'est pas restauré au niveau de la ramification du système aérien. Ces résultats suggèrent que SMAX1 bien qu'impliqué dans la voie de signalisation des SL au niveau de la germination, n'est pas impliqué dans la ramification du système aérien.

La protéine BES1 (BRASSINOSTEROID INSENSITIVE1 EMS SUPPRESSORS) est un facteur de transcription précédemment identifié dans la voie de signalisation des BR, régulant les gènes de réponse aux BR (Yin et *al.,* 2002 ; Vert and Chory 2006). BES1 et ses protéines apparentées sont également des cibles du complexe d'ubiquitination MAX2, décrites dans la voie de signalisation des SL menant au contrôle de la ramification des tiges (Wang et *al.,* 2013a)**.**

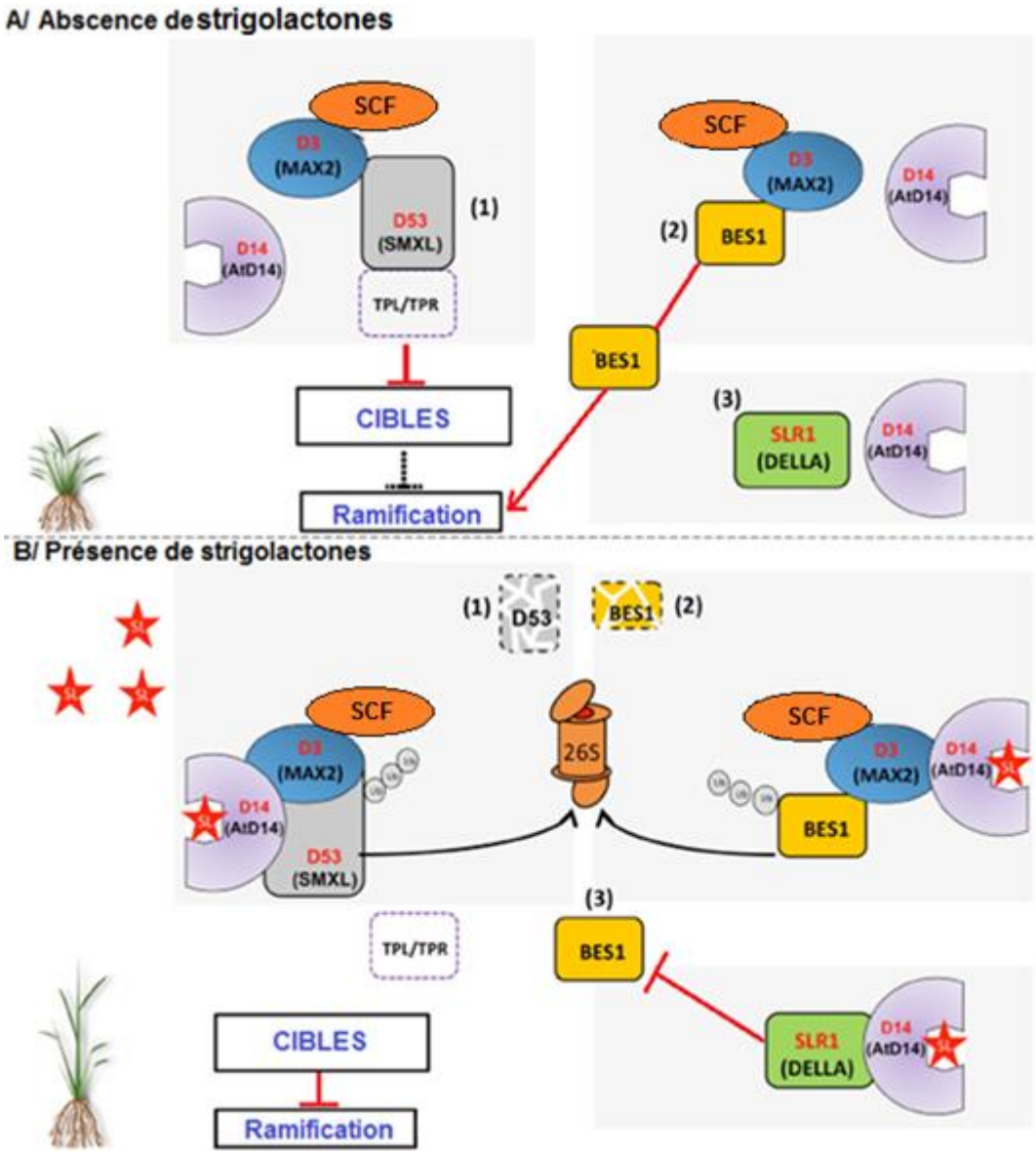


Fig. I.18 Modèle proposé de la voie de transduction du signal strigolactone dans l'inhibition de la ramification des tiges. (*D'après Zheng et al., 2014*)

A/ En absence de SL, les plantes sont plus ramifiées, probablement du fait de : (1) la stabilisation du complexe D53/TPL/TPR par D3, qui peut alors inhiber les régulateurs de la ramification ; (2) BES1 sous forme active et stabilisée par le complexe MAX2 peut alors stimuler la ramification ; (3) SLR1 (DELLA) n'est pas active et ne peut donc pas fixer BES1 afin de l'inactiver.
B/En présence de SL, la ramification est inhibée, probablement due à : (1) La dégradation de D53 par le protéasome, ce qui lève sa régulation négative sur les régulateur de la ramification. (2) BES1 est en partie dégradée par le protéasome, (3) Formation d'un complexe D14/SLR1/BES1, inhibant l'action stimulatrice de BES1 sur la ramification.

- *Cibles potentiels du complexe SCF^{MAX2}-E3 et de D14*

En présence de SL, D14 recrute le complexe SCF^{MAX2}-E3, ce qui provoque l'ubiquitination et la dégradation de BES1 (Zheng et *al.*, 2014). Wang et ses collaborateurs (2013a) proposent alors l'hypothèse qu'en absence de SL, MAX2 permet de stabiliser BES1. Cette stabilité est alors perdue en présence de SL. Par ailleurs, bien que les mutants *bes1*, insensibles aux SL exogènes, présentent une altération de leur phénotype au niveau de la ramification des tiges, les autres mutants dans la voie de transduction des BR ne présentent aucune altération de la ramification. Ceci suggère une implication de BES1, MAX2 dépendante, dans le contrôle de l'architecture aérienne et dans la voie de signalisation des SL (Wang et *al.*, 2013a).

Par ailleurs, Il a récemment été mis en évidence par des expériences de double hybride chez la levure, que la protéine de riz SLR1 (DELLA) – également connue en tant que répresseur de la transcription des GA – était capable d'interagir avec D14 de manière SL dépendante (Nakamura et *al.*, 2013). De plus, Li et collaborateurs (2012) ont mis en évidence que SLR1 (DELLA) est capable d'interagir avec BES1. Ces études permettent alors de supposer qu'en présence de SL, un complexe D14-SLR1-BES1 peut se former, inhibant les capacités de liaison à l'ADN de BES1, ce qui permet de réprimer la ramification.

Pris ensembles, ces résultats permettent de proposer un modèle putatif mais cohérent de la voie de transduction du signal SL dans l'inhibition de la ramification du système aérien (Fig. I.19).

Sujet de recherche

Étude des mécanismes impliqués dans la perception des stimulants de germination menant à la germination des plantes parasites des genres *Orobanche* et *Phelipanche*

Le Laboratoire de Biologie et de Pathologie Végétales (LBPV) a pour spécialité l'expertise des interactions entre les plantes de grandes cultures et les plantes parasites. Le LBPV s'est cependant spécialisé depuis quelques années sur l'étude exclusive des orobanches et de leur plantes hôtes. Dans ce contexte, différents traits de vie participant à l'agressivité de *P. ramosa* sont étudiés, notamment les processus d'induction de l'*haustorium*, le développement de la force de puits et la germination. Une meilleure compréhension de ces adaptations au mode de vie parasitaire permettrait de mieux appréhender la gestion de ce parasite au sein des agrosystèmes.

L'étape de germination des orobanches est une des étapes clé du cycle de vie de ces parasites, elle est soumise à la perception de stimulants de germination exsudés dans la rhizosphère par leurs plantes hôtes. Bien que le rôle des strigolactones ait été révélé depuis près de 50 ans, presque rien n'est connu quant aux mécanismes sous-jacents intervenant au cours de ces différentes phases. Ce manque de données provient en majorité du manque de ressources génomiques, de l'absence de mutants, ou encore de l'absence de méthodes de transformation. Mes travaux de thèse se sont intéressés plus spécifiquement à l'étude des particularités de la germination, et avait pour objectif de mieux comprendre certains de ses mécanismes.

Le premier chapitre de cette thèse se présente sous forme d'article, publié dans *Journal of Experimental Botany*. Il s'intéresse plus spécifiquement à la réponse moléculaire précoce au GR24 des graines conditionnées de *P. ramosa*. Cette étude a permis de mettre en évidence un effecteur précoce de la voie des SL, le gène *PrCYP707A1* permettant le catabolisme de l'ABA et la levée de dormance.

Le second chapitre quant à lui, rédigé sous forme d'article en français non encore soumis, élargit les investigations menées chez *P. ramosa* par l'étude de la germination en réponse à des stimulants de germination variés, chez diverses plantes parasites en comparaison avec *A. thaliana*. Les analyses réalisées ont permis la mise en évidence d'une voie de réponse aux SL aboutissant à l'expression d'un gène *CYP707A* chez ces différentes espèces. Par ailleurs, l'utilisation d'*A. thaliana* comme outil a permis de mettre en évidence l'importance de la protéine MAX2.

Le troisième chapitre poursuit la comparaison de la germination, en réponse aux SL, entre notre modèle d'étude *P. ramosa* et *A. thaliana*. Il permet de clarifier les facteurs permettant la surexpression du gène *PrCYP707A1* et révèle l'importance des protéines α/β hydrolases et du protéasome 26S, dans la voie de réponse aux stimulants lors de la germination des plantes parasites.

Le quatrième et dernier chapitre, sous forme d'article soumis dans *Journal of Experimental Botany*, revient plus spécifiquement sur l'étape de conditionnement de notre modèle d'étude *P. ramosa*. Il met en évidence l'importance de processus épigénétiques, notamment au niveau du promoteur *PrCYP707A1*, dans le contrôle de cette phase aboutissant à la réceptivité des graines aux stimulants de germination.

Chapitre I

Induction strigolactone dépendante de *PrCYP707A1* : Gène de catabolisme de l'acide abscissique et acteur clé de la germination de *P. ramosa*

Introduction

Les connaissances quant aux événements se déroulant lors des étapes de germination des plantes parasites sont à ce jour encore très fragmentaires. En effet, bien que le rôle des SL en tant que stimulant de germination soit connu depuis plusieurs décennies, pratiquement rien n'est connu quant aux évènements précoces régissant la germination des plantes parasites en réponse aux SL.

Dans le but de compléter les connaissances actuelles sur les mécanismes de germination des plantes parasites, les deux étapes de germination de notre plante modèle *Phelipanche ramosa* ont été étudiées. Une caractérisation physiologique des graines au cours du conditionnement ainsi qu'une étude transcriptomique sans *a priori* via une technique de cDNA-AFLP, ont été réalisées. Le transcriptome partiel de graines conditionnées mais non stimulées a été comparé à ceux de graines conditionnées puis stimulées durant 2 h ou 6 h. Les résultats issus de ces expérimentations ont permis de mettre en évidence environ 2500 fragments dérivés de la transcription (TDF), dont certains présentaient des profils d'expression différentiels en réponse au GR24. Deux d'entre eux, codant une protéine associée à des fonctions biologiques significatives dans la germination, ont ensuite été ciblés pour être étudiés en détail. Cette étude plus précise a été réalisée à l'aide d'approches transcriptomiques et pharmacologiques. Ces approches ont permis de mettre en évidence une voie particulièrement importante dans le processus de germination ayant donné lieu à une publication.

L'étude de certains autres candidats (TDF) fournis par la cDNA-AFLP et identifiés comme potentiellement impliqués dans la germination, ainsi que l'évolution de marqueurs de l'équilibre hormonal ABA/GA, sont présentés en complément.

1- Article publié:

***PrCYP707A1*, an ABA catabolic gene, is a key component of *Phelipanche ramosa* seed germination in response to the strigolactone analogue GR24.**

(

Journal of Experimental Botany, Vol. 63, No. 14, pp. 5311–5322, 2012
doi:10.1093/jxb/ers189 Advance Access publication 1 August, 2012

This paper is available online free of all access charges (see http://jxb.oxfordjournals.org/open_access.html for further details)

Journal of Experimental Botany
www.jxb.oxfordjournals.org

RESEARCH PAPER

PrCYP707A1, an ABA catabolic gene, is a key component of *Phelipanche ramosa* seed germination in response to the strigolactone analogue GR24

Marc-Marie Lechat[1], Jean-Bernard Pouvreau[1], Thomas Péron[1], Mathieu Gauthier[1], Grégory Montiel[1], Christophe Véronési[1], Yasushi Todoroki[2], Bruno Le Bizec[3], Fabrice Monteau[3], David Macherel[4], Philippe Simier[1], Séverine Thoiron[1] and Philippe Delavault[1,*]

[1] Laboratoire de Biologie et Pathologie Végétales, SFR 4207 QUASAV, LUNAM University, Nantes, France
[2] Department of Applied Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Shizuoka University, Shizuoka, Japan
[3] LABERCA, Oniris, LUNAM University, Nantes, France
[4] Institut de Recherche en Horticulture et Semences, UMR 1345 INRA, Agrocampus Ouest, Université d'Angers, SFR 4207 QUASAV, Angers, France

* To whom correspondence should be addressed. E-mail : philippe.delavault@univ-nantes.fr

Received 26 April 2012; Revised 23 May 2012; Accepted 31 May 2012

Abbreviations: ABA, abscisic acid; Abz, abscinazole; AEC; adenylate energy charge; AFLP, amplified fragment length polymorphism; RACE, rapid amplification of cDNA ends; SL, strigolactone; TDF, transcript-derived fragment.

© The Author [2012]. Published by Oxford University Press [on behalf of the Society for Experimental Biology]. All rights reserved.

For Permissions, please e-mail: journals.permissions@oup.com

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License(http://creativecommons.org/licenses/ by-nc/2.0/uk/) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

(

Abstract

After a conditioning period, seed dormancy in obligate root parasitic plants is released by a chemical stimulus secreted by the roots of host plants. Using *Phelipanche ramosa* as the model, experiments conducted in this study showed that seeds require a conditioning period of at least 4 d to be receptive to the synthetic germination stimulant GR24. A cDNA-AFLP procedure on seeds revealed 58 transcript-derived fragments (TDFs) whose expression pattern changed upon GR24 treatment. Among the isolated TDFs, two up-regulated sequences corresponded to an abscisic acid (ABA) catabolic gene, *PrCYP707A1*, encoding an ABA 8'-hydroxylase. Using the rapid amplification of cDNA ends method, two full-length cDNAs, *PrCYP707A1* and *PrCYP707A2*, were isolated from seeds. Both genes were always expressed at low levels during conditioning during which an initial decline in ABA levels was recorded. GR24 application after conditioning triggered a strong up-regulation of *PrCYP707A1* during the first 18 h, followed by an 8-fold decrease in ABA levels detectable 3 d after treatment. *In situ* hybridization experiments on GR24-treated seeds revealed a specific *PrCYP707A1* mRNA accumulation in the cells located between the embryo and the micropyle. Abz-E2B, a specific inhibitor of CYP707A enzymes, significantly impeded seed germination, proving to be a non-competitive antagonist of GR24 with reversible inhibitory activity. These results demonstrate that *P. ramosa* seed dormancy release relies on ABA catabolism mediated by the GR24-dependent activation of *PrCYP707A1*. In addition, *in situ* hybridization corroborates the putative location of cells receptive to the germination stimulants in seeds.

Key words: ABA, CYP707A inhibitor, parasitic plant, *Phelipanche ramosa*, seed germination, strigolactone

Introduction

Broomrape species (*Orobanche* spp. and *Phelipanche* spp.) are obligate root parasitic plants devoid of chlorophyll that exclusively depend on their hosts for their nutritional needs. Although most broomrape species develop in natural ecosystems with no significant damage on their host plants, some are harmful parasitic weeds in important crops. These pests include *Orobanche cumana* on sunflower, *Orobanche crenata* and *Orobanche foetida* on legumes, and *Phelipanche ramosa* and *Phelipanche aegyptiaca* on tomato (Parker, 2009). They all have an extraordinary capacity for dissemination because each individual plant may produce up to 500 000 extremely small seeds (between 200 µm and 400 µm) containing an acotyledoneous reduced

embryo (Joel *et al.*, 2011). The weedy life cycle of broomrapes is well-described with regard to its major host plants (Joel *et al.*, 2007). Seed germination is induced by chemical signals exuded in the rhizosphere by host roots and leads to the emergence of a radicle that attaches to the host root surface. Most germination stimulants identified thus far belong to the strigolactone (SL) family (Yoneyama *et al.*, 2010), although dehydrocostus lactone, polyphenols, and isothiocyanates may be involved in the germination of *O. cumana* (Joel *et al.*, 2011), *O. foetida* (Evidente *et al.*, 2010), and *P. ramosa* (Auger *et al.*, 2012), respectively. Whatever the nature of the germination stimulant, several preparatory processes generally take place during a conditioning phase before the response to germination stimulants is possible (Joel *et al.*, 1995 b). Seed hydration (Joel *et al.*, 2007) and major metabolic pathways are initiated during seed conditioning, which thus displays a characteristic pattern of respiration, protein synthesis, and the utilization of reducing sugars (Bar-Nun and Mayer, 1993, 2002). However, some broomrape species may not require this conditioning phase (Plakhine *et al.*, 2009).

SLs are a novel class of plant hormones involved in controlling shoot branching inhibition (Gomez-Roldan *et al.*, 2008; Umehara *et al.*, 2008). Several studies have investigated the SL signalling pathway in plants as well as the relationships between SLs and other phytohormones during the control of plant architecture. SLs interact with auxin and cytokinins (CK) in bud outgrowth control (Crawford *et al.*, 2010; Dun *et al.*, 2012) or during adventitious root initiation (Rasmussen *et al.*, 2012). In addition, cross-talk can occur between SLs, auxin, and ethylene in the control of root hair elongation (Kapulnik *et al.*, 2011). Finally, an ABC transporter has been shown to be a component of SL transport functioning as a cellular exporter (Kretzschmar *et al.*, 2012). By contrast, although the key role of SLs as germination stimulants has been known for several decades (Cook *et al.*, 1966), almost nothing is known about the early molecular events governing the germination of root parasitic plants in response to SLs, nor about how SLs interact with parasite phytohormones during this process. The isolation of SL receptors has remained elusive and their subcellular location is still unknown despite several structure–activity studies (Zwanenburg *et al.*, 2009). To date, the only systematic analysis of hormonal patterns in parasitic plant seeds was performed in *Striga hermonthica*, a chlorophyllous parasitic plant, and suggests that gibberellins (GA), abscisic acid (ABA), and CK are involved in seed germination (Toh *et al.*, 2012). In addition, several studies, mainly using pharmacological approaches, have shed light on the hormonal control of the seed response to germination stimulants. The application of GA biosynthesis inhibitors (e.g. uniconazole) during seed conditioning inhibits the subsequent germination of *P. ramosa*, *P. aegyptiaca*, and *O. minor* in response to the germination stimulants, GR24 and strigol (Zehhar *et al.*, 2002; Song *et al.*, 2005; Uematsu *et al.*, 2007) suggesting that

broomrape seed germination takes place under the control of GA. Nevertheless, it has been demonstrated that compounds such as uniconazole are also potent inhibitors of ABA catabolism (Saito *et al.*, 2006). Thus, the inhibitory effect of uniconazole leading to persistent seed dormancy may also be due to enhanced levels of ABA in treated seed. Accordingly, exogenous ABA application inhibits *P. ramosa* seed germination (Zehhar *et al.*, 2002). In addition, 7 d conditioned seeds of *O. minor* show a massive reduction in ABA levels together with a high release in the medium before responding positively to germination stimulants (Chae *et al.*, 2004). These results suggest that broomrape seeds require a sufficiently low ABA content to germinate upon the application of germination stimulation. Ethylene has also been considered as a potential regulator of broomrape germination since the application of ethylene synthesis inhibitors during seed conditioning inhibits the subsequent germination of *P. ramosa* seeds in the presence of GR24 (Zehhar *et al.*, 2002).

The molecular response of seeds to SLs has not been well investigated due to the lack of genomic resources in parasitic plants. However, the Parasitic Plant Genome Project (PPGP) has made progress recently and ESTs from key developmental stages of *S. hermonthica* and *P. aegyptiaca* have been identified (Westwood *et al.*, 2011). Here, the study starting from a genome-wide expression profiling (cDNA-AFLP) on *P. ramosa*—a closely related species to *P. aegyptiaca*—demonstrates the relationships between ABA catabolism and the expression of an ABA catabolism gene, *PrCYP707A1*, during the initiation of seed germination. The results indicate that *PrCYP707A1* may be a major molecular component of the seed response to SLs in a root parasitic plant.

Materials and methods

Plant material and chemical treatments

P. ramosa L. Pomel seeds were collected in 2011 from mature flowering spikes growing on winter oilseed rape (*Brassica napus* L.) in Saint-Martin-de-Fraigneau, France, and stored at 25 °C in darkness. *P. ramosa* seeds were surface-sterilized for 5 min with 12% sodium hypochlorite and thoroughly rinsed three times with sterile distilled water. Seeds were then suspended in 1 mM Na/K phosphate buffer (pH 7.5) with a ratio of 10 mg seeds ml^{-1}. Seeds were then placed in the dark at 21 °C during the conditioning period. Unless otherwise mentioned, the conditioning period was 7 d. The conditioned seeds were stimulated by adding the synthetic SL GR24 at a final concentration of 10^{-9} M in 0.1% acetone. GR24 treatments were carried out at 21 °C in the dark. Corresponding control seeds were treated with 0.1% acetone. After these

treatments, seeds were collected by filtration onto a 100 µm nylon mesh, blotted on absorbent paper and weighed. Seeds were then frozen in liquid nitrogen and stored at –80 °C before RNA, ABA or adenylate extraction. ABA 8'-hydroxylase (CYP707A) inhibitors abscinazole-E1 (Abz-E1) and abscinazole-E2B (Abz-E2B) (Okazaki *et al.*, 2011, 2012) were solubilized in acetone and used for germination assays at various concentrations in 0.1% acetone.

Imbibition and adenylate energy charge determination

Seed imbibition was determined as described by Joel *et al*. (2011). Adenylate Energy Charge (AEC = ATP+0.5 ADP/AMP+ADP+ATP) was determined by quantifying adenine nucleotides extracted from 100 mg of seeds, essentially as described by Borisjuk *et al*. (2007). AMP, ADP, and ATP were separated by high-performance liquid chromatography (HPLC) on an IonPac AS11 column (Dionex Corp., Sunnyvale, CA, USA) and quantification was done using a standard curve of known concentrations.

Seeds were conditioned by suspending around 100 sterilized seeds in 1 mM Na/K phosphate buffer (pH 7.5) and distributing them in a 96-well plate (Cell Culture Multiwell Plate Cellstar; Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany), and then stored for 7 d at 21 °C in the dark. Abz-E1, Abz-E2B and/or GR24 solutions were added to each well and volumes were adjusted to 100 µl with sterile distilled water to 0.2% acetone (final concentration). A 0.2% acetone solution was used as a negative control. Subsequently, plates were incubated for 3 d at 21 °C in the dark and germinated seeds were counted under a stereo microscope (Olympus SZX10; Olympus Europa GmbH, Hamburg, Germany). Seeds were considered as germinated when the radicle protruded out of the seed coat. Each germination assay was repeated at least three times.

For the ABA catabolism inhibitors (Abz-E1 and Abz-E2B) and GR24, IC_{50} and EC_{50} ±standard errors (SE), respectively, were determined from the dose–response curves [$g = f(c)$, where g is the germination percentage as a function (f) of (c) concentration of the compound tested] and modelled with a four parameter logistic curve on at least three independent dilution ranges. Data were computed with SigmaPlot® V.10.0 (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA). An analysis of variance was performed on the results using SigmaPlot version 10.0 (P <0.05; Student–Newman–Keuls test, SNK).

For seed viability tests following the addition of Abz-E1 and Abz-E2B, treated seeds were washed three times with 100 µl of 1 mM Na/K phosphate buffer (pH 7.5) after an initial count. Then, 100 µl of 10^{-9} GR24 in 0.1% acetone were applied to the washed seeds. Plates were incubated as mentioned above prior to the determination of germination percentage.

cDNA-AFLP analysis

Total RNA was extracted from 100 mg of 7 d conditioned seeds (control) and conditioned seeds treated with GR24 for 2 h and 6 h, using the RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). Extracts were treated with DNase I (0.02 U μl^{-1}, New England Biolabs, Ipswich, MA, USA). The integrity of total RNA was checked by electrophoresis on a 2% (w/v) agarose gel and RNA was quantified spectrophotometrically (A260/280; NanoDrop Spectrophotometer ND-1000, Labtech International Ltd, Rigmer, UK). Starting from 2 µg of total RNA, the AFLP-based transcript profiling (cDNA-AFLP) was performed as described by Vuylsteke *et al.* (2007). All 32 possible primer combinations were performed. Selective [γ-^{33}P] ATP-labelled amplification products were separated on 8% polyacrylamide gels with the Model S2001 apparatus (Life Technologies, Paisley, UK). Dried gels were exposed to Biomax film (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA).

Sequence analysis of TDFs

The GR24-regulated TDFs were recovered by PCR under the same conditions used for the pre-amplification. Purified PCR products were sequenced (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Germany) and a similarity search was done with BLASTN and BLASTX sequence alignments against the nucleotide and protein sequences in the available databases from the Parasitic Plant Genome Project (PPGP, http://ppgp.huck.psu. edu/) and The *Arabidopsis* Information Resource (TAIR, http://www. arabidopsis.org/). Functional categorization of TDFs was done using the Blast2Go program (www.Blast2GO.de).

Cloning of PrCYP707A *cDNAs*

Total RNA isolated from 6 h GR24-treated conditioned seeds underwent a reverse transcription procedure. cDNAs were synthesized from 0.5 µg of total RNA using the Superscript II Reverse Transcriptase kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Degenerate and specific primers corresponding to highly conserved regions between *P. aegyptiaca* and *S. hermonthica* CYP707A sequences were designed. After denaturation at 94 °C for 5 min, amplification consisted of 35 cycles of 45 s at 94 °C, 45 s at 55 °C, and 30 s, 45 s or 90 s at 72 °C. A final step of elongation was done at 72 °C for 5 min. The amplified DNA fragments were purified and cloned into a pGEM-T Easy vector (Promega, Madison, WI, USA). Recombinant plasmid DNAs were sequenced. Based on these partial *CYP707A* sequences, new primers were generated for rapid amplification of cDNA ends (RACE) of each fragment using the Generacer kit (Invitrogen). RACE products corresponding to different CYP707A-encoding genes were cloned and

sequenced. To amplify the *PrCYP707A* full-length cDNAs, specific primer pairs were designed. Sequence data from this article can be found in the GenBank/ EMBL databanks under accession numbers JQ838174 (*PrCYP707A1*) and JQ838175 (*PrCYP707A2*).

Real-time RT-PCR analysis

Total RNA was extracted from 200 mg of seeds and DNase I-treated using the same procedure as for the cDNA-AFLP analysis. cDNA was synthesised from 0.5 µg of total RNA using the Superscript II Reverse Transcriptase (Invitrogen) following the manufacturer's instructions. Then, 5 ng of cDNA was used in 25 µl reactions containing 0.3 µM gene-specific primers and 6.25 µl platinum SYBR Green qPCR SuperMix with ROX (Invitrogen). PCR reactions for three biological replicates were performed each in triplicate with a 7300 real-time PCR system according to the manufacturer's protocol (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). Fold change in RNA expression was estimated using threshold cycles. The amplicon of the constitutive elongation factor *PrEF1α1* (forward, 5'-AGTGCTCAGTGGTGGCTCAAC-3' and reverse, 5'-CTGGAGCAACAACCTTAATCTTC-3'), which showed low cycle threshold (Ct) variation (standard deviation <1 Ct), was used as an internal control to normalize all the data (Péron *et al.*, 2012). A control experiment without cDNA was included for each PCR mix. The following gene-specific primers were used: *PrCYP707A1* (forward, 5'-GCCCGCTCTCAAAAGCTAAA-3' and reverse, 5'-TTGTAACAGATTTGGGCTTTTGG-3') and*PrCYP707A2* (forward, 5'-TCCTCTTCCCCAAAATGGTTT-3' and reverse, 5'-TTTGGTTTTGGACACATGTTACTCTT-3'). An analysis of variance was performed on the results from qPCR analyses using SigmaPlot version 10.0. Means of three independent RNA isolations were tested at $P < 0.05$ (SNK test).

PrCYP707A1 in situ hybridization

Digoxigenin (DIG)-labelled RNA probes were prepared using an *in vitro* transcription kit (Riboprobe Combination Systems, Promega, Madison, USA) according to the manufacturer's instructions. The riboprobes were synthesized from the full-length *PrCYP707A1* clone. Antisense and sense probes were transcribed from SP6 or T7 RNA polymerase promoters after linearisation of the vector with *Apa*I or *Nde*I, respectively. Samples of conditioned untreated or GR24-treated (6 h) seeds were prepared and *in situ* hybridization experiments were performed as previously described (Péron *et al.*, 2012).

ABA quantification

ABA concentrations in seeds were determined according to Müller and Munné-Bosch (2011) with minor modifications. First, 200 mg of seeds were ground in liquid nitrogen and extracted in acetonitrile:water:acetic acid (49.5:49.5:1, by vol.). D_6-ABA, [(*S*)-5-[2H 6](1-hydroxy-2,6, 6 -trimethyl-4-oxocyclohex-2-en-1-yl)-3-methyl-(2Z,4E)-pentadienoic acid)] was used as the internal standard and added in all samples (5×10^{-9} mol) and in non-labelled ABA standard calibration solutions (5×10^{-9} to 10^{-5} mol l^{-1}). Analysis were performed on a liquid chromatograph Agilent 1200 series system (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA) coupled to a LTQ OrbitrapMS (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). A Hypersil GOLD column (100 × 2.1 mm, 1.9 µm) equipped with a guard column (Phenomenex, Le Pecq, France) was used. Gradient elution was done with water:0.1% acetic acid (solvent A) and acetonitrile (solvent B). The gradient profile was linear and applied as follows: (t (min), % A): (0, 100%), (1, 100%), (10, 0%), (15, 0%), (18, 100%), (20, 100%). The flow rate was maintained constant at 0.5 ml min^{-1}. ABA and D_6-ABA were ionized in an electrospray mode. Ion characterization was realized at a resolution better than 30 000 (FWHM). A mass accuracy better than 10 ppm was assured for parent ion (ABA: *m/z*, 263.1277856; rt = 6.94 ± 0.01 min; D6-ABA: *m/z*, 269.166543; rt = 6.92 ± 0.02 min). An analysis of variance was performed on the results from ABA quantification using SigmaPlot version 10.0. Means of six independent metabolite extractions were tested at $P < 0.05$ (SNK test).

Results

GR24 response, imbibition, and energy metabolism of seeds during conditioning

Prior to germination, broomrape seeds require a conditioning period with moist conditions and suitable temperatures to be receptive to germination stimulants (Joel *et al.*, 1995b). To evaluate the effect of conditioning period length on the GR24-triggered germination, conditioning periods ranging from 1–10 d were tested before seeds were treated with GR24 (Fig. 1.1 A). Conditioning periods of 4 d or longer led to a statistically equivalent optimal germination response to GR24, ranging from 66 ± 3 to 78 ± 8% (ANOVA, $P = 0.287$), whereas shorter conditioning periods from 0–3 d hampered seed germination. When conditioning was sufficiently long, seed germination, corresponding to the radicle protrusion out of the seed coat, was synchronous and occurred 3 d after adding GR24.

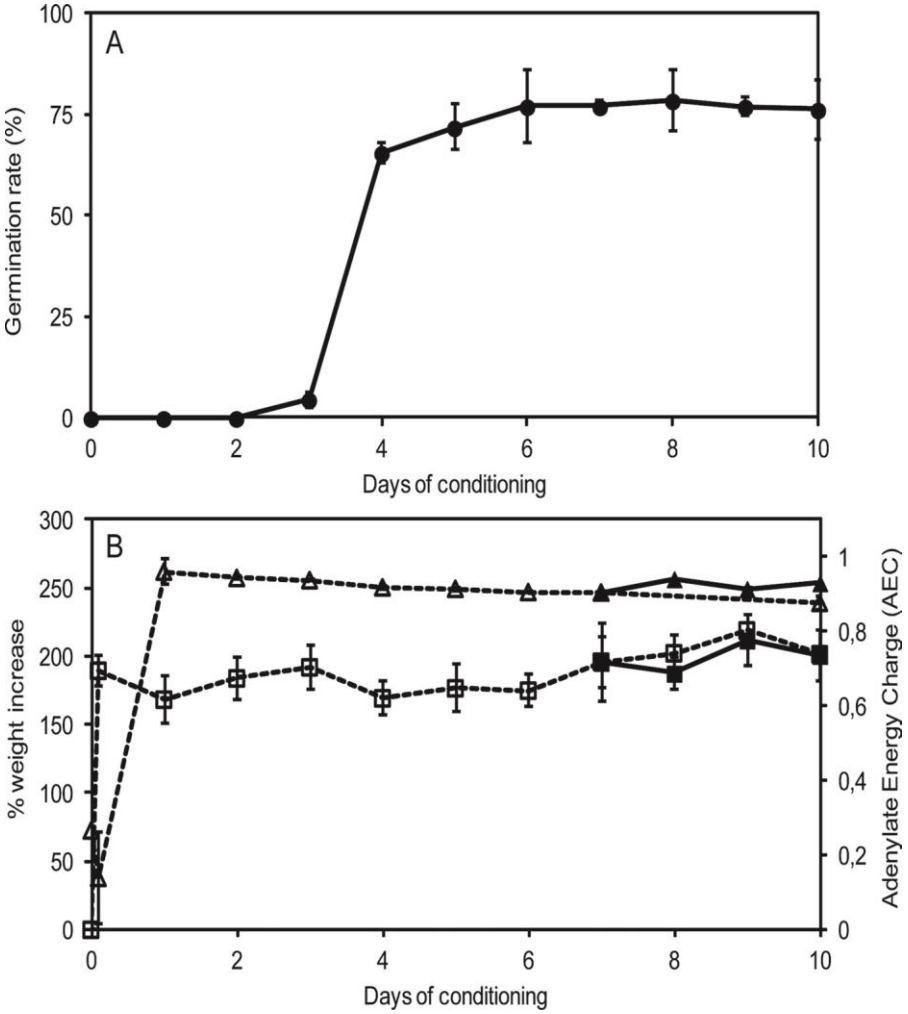


Fig. 1.1 Characterization of *P. ramosa* seed conditioning and germination.

(A) Effect of the length of the conditioning period on seed germination. Germination percentages of seeds conditioned for different periods were determined 3 d after the addition of 1 nM GR24. Means are values ± SE. **(B)** Imbibition (squares) and adenylate energy charge (triangles) time-course during conditioning (open symbols and dotted line) and germination (filled symbols and solid line). Seeds were stimulated with 1 nM GR24 after a 7 d conditioning period. Means are values ± SE.

Imbibition and AEC of seeds were determined during conditioning (Fig. 1.1B). *P. ramosa* seeds were fully imbibed after 1 h of soaking (189 ± 5% weight increase) and seed fresh weight remained constant over the next 10 d, in both untreated seeds and seeds treated with GR24 after the 7 d conditioning period. Along with rapid imbibition, a rapid and transient decrease in AEC was observed during the first hour of conditioning. AEC then increased and reached a maximum of 0.9 after 1 d of conditioning and remained constant for the next 9 d, for both GR24-treated seeds and the controls. These results indicate that, as of the first day of the conditioning period, seeds were fully hydrated and not limited in terms of energy metabolism, but unable to respond to GR24 before 4 d of conditioning. A standard 7 d conditioning period was chosen arbitrarily for the subsequent experiments.

Transcriptomic response of P. ramosa *seeds to GR24*

To investigate the early molecular response of *P. ramosa* seeds to GR24, the transcriptomic profiles of GR24-treated seeds (2 h and 6 h treatments) and non-GR24-treated seeds (control) were compared using cDNA-amplified fragment length polymorphism (Vuylsteke *et al.*, 2007). Both GR24-treatment triggered seed germination 3 d later. The 32 primer combinations produced some 2500 TDFs, of which 58 showed an apparent differential expression between samples, including 43 up-regulated genes and 15 down-regulated genes when compared with control levels. Among the 58 sequenced TDFs, 44 showed a significant BLAST hit to sequences found in public databases (Table 1), with 12 TDFs corresponding to unknown proteins. Functional categorization was done using the Blast2GO program. Analysing the 32 annotated sequences according to biological function revealed that, nearly one-third of the sequences (12) encode proteins involved in ‘stress responses’, followed by sequences encoding proteins involved in metabolic processes (9), nucleotide binding (4), oxidation-reduction processes (2), translation (1), transport (1), and, finally, unknown (3). Among the annotated TDFs, two (TDF30 and 37) corresponded to sequences encoding an ABA 8'-hydroxylase (cytochrome P450 CYP707A) that catalyses the C8'-hydroxylation of ABA to 8'-hydroxy-ABA and phaseic acid (Nambara and Marion-Poll, 2005). Compared with the control, both TDFs showed a strong up-regulation in seeds after 2 h and 6 h of GR24 treatment. Because CYP707A proteins belong to an enzyme family involved in the control of ABA levels during seed dormancy maintenance and breaking (Kushiro *et al.*, 2004; Saito *et al.*, 2004; Okamoto *et al.*, 2006), TDF30 and 37 were selected for further analysis.

Tab. 1.1 List of TDFs modulated in *P. ramosa* conditioned seeds treated for 2 h or 6 h with GR24.

TDF no.	Regulation*		Best *Arabidopsis* hit (Accession no.)	Functional category	*E* value
	2 h	6h			
1	+	+	Sulphite reductase (NP_196079)	Oxidation–reduction processes	2.00E–08
3	+	+	60S ribosomal protein L8-3 (NP_195336)	Translation	3.00E–12
5	+	O	Sucrose synthase 3 (NP_192137)	Carbohydrate metabolic processes	6.00E–30
6	–	–	High mobility group (HMG1/2) domain-containing protein (NP_565788)	Nucleotide binding	8.00E–17
7	O	–	Ninja-family protein AFP3 (NP_189598)	Nucleotide binding	7.00E–19
8	O	+	Peptidylprolyl isomerase ROF2 (NP_199668)	Response to stress	6.00E–22
11	O	+	Heat shock protein 81.4 (NP_200411)	Response to stress	3.00E–65
13	O	+	PPPDE putative thiol peptidase family protein (NP_187365)	Unknown	1.00E–24
14	O	+	Rossmann-fold NAD(P)-binding domain-containing protein (NP_175552)	Oxidation–reduction processes	1.00E–16
15	+	O	Aldolase-type TIM barrel family protein (AED97862)	Response to stress	8.00E–15
16	+	+	Phosphatidylethanolamine-binding protein (NP_195750)	Unknown	0.001
20	+	O	*Trans*-cinnamate 4-monooxygenase (NP_180607)	Secondary metabolic processes	0.006
26	+	O	HIPL2 protein (NP_201069)	Carbohydrate metabolic processes	3.00E–08
28	+	+	Methionine synthase 2 (NP_001118564)	Cellular amino acid metabolic processes	3.00E–21
30	+	+	Abscisic acid 8'-hydroxylase 1 (NP_974574)	Response to stress	0.007
31	+	O	Acetylornithine deacetylase (NP_001190758)	Protein metabolic processes	0.091
32	–	–	26S proteasome regulatory subunit 4-A (NP_194633)	Protein metabolic processes	1
33	+	+	RNA recognition motif-containing protein (NP_197436)	Nucleotide binding	2.00E–23
36	O	+	Heat shock 70 kDa protein 1 (NP_195870)	Response to stress	0.073
37	+	+	Abscisic acid 8'-hydroxylase 1 (NP_974574)	Response to stress	0.001
38	O	–	BI1-like protein (NP_567466)	Unknown	3.00E–16
39	+	+	Heat shock protein 81-1 (NP_200076)	Response to stress	3.00E–23
40	+	O	Putative aquaporin TIP3-2 (NP_173223)	Transport	6.00E–50
41	+	+	Beta-glucosidase 44 (NP_188436)	Carbohydrate metabolic processes	5.00E–41
42	+	+	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate homocysteine methyltransferase (NP_197294)	Cellular amino acid metabolic processes	1.00E–16
44	O	+	Glutathione *S*-transferase PM24 (NP_192161)	Response to stress	6.00E–06
45	O	+	Heat shock protein 21 (NP_194497)	Response to stress	0.02
48	+	O	Splicing factor U2af large subunit B (NP_176287)	Nucleotide binding	1.00E–06
49	+	O	Catalase 2 (NP_195235)	Response to stress	1.00E–48
50	+	O	Heat shock protein 70B (NP_173055)	Response to stress	1.00E–79
51	+	O	Phenylalanine ammonia-lyase 3 (NP_001190223)	Response to stress	6.00E–10
58	O	+	Putative xyloglucan glycosyltransferase 8 (NP_180039)	Carbohydrate metabolic processes	1.00E–26

Compared with the non-treated control sample, (+) corresponds to an up-regulation, (–) a down-regulation, and (O) no change

Molecular cloning of CYP707A *homologues in* P. ramosa

Sixty-three and 25 ESTs correspond to putative sequences encoding a cytochrome P450 CYP707A in *P. aegyptiaca* and *S. hermonthica* EST libraries (PPGP database), respectively. Using alignment and contig procedures, three full-length cDNA sequences (*PaCYP707A1*, *PaCYP707A2*, and *PaCYP707A3*) were identified in *P. aegyptiaca* and two full-length (*ShCYP707A1* and *ShCYP707A2*) and one partial (*ShCYP707A3*) cDNA sequences in *S. hermonthica*. Based on these sequences, several sets of primers were designed and used in RACE experiments, leading to the identification of two full-length *P. ramosa* cDNA sequences of 1770 (*PrCYP707A1*) and 1645 bp (*PrCYP707A2*). Despite several attempts, amplification of a sequence corresponding to *PaCYP707A3* was unsuccessful. Possible reasons include that the corresponding gene is not present in *P. ramosa* or is not expressed at the times tested or exhibits a divergent sequence. The predicted amino-acid sequences of the *PrCYP707A1* and *PrCYP707A2* genes showed high sequence identity with each other (77.6%), and with *AtCYP707A3* (74.1%) and *AtCYP707A1* (73.5%), respectively, when compared with the four *Arabidopsis* CYP707A protein sequences. Sequence comparison did not allow the attribution of *Arabidopsis* orthologues to both *P. ramosa* sequences. Both TDF30 and TDF37 corresponded to *PrCYP707A1*.

Change in PrCYP707A *gene expression in* P. ramosa *seeds after GR24 treatment*

After conditioning, the expression patterns of *PrCYP707A1* and *PrCYP707A2* were examined in detail during a 3 d GR24 treatment (Fig. 1.2). While levels of *PrCYP707A2* mRNA were low and did not change upon GR24 treatment (data not shown), the expression level of *PrCYP707A1* showed a rapid and strong significant increase as of 1 h (Fig. 1.2A) and reached a peak 18 h (Fig. 1.2B) after the addition of GR24. After 24 h, *PrCYP707A1* mRNA levels dropped, reaching a value similar to that observed the first 30 min, and remained stable for the next 48 h.

PrCYP707A1 *is up-regulated by GR24 after a minimum conditioning period*

First, the expression patterns of *PrCYP707A1* and *PrCYP707A2* were examined during conditioning. No change in mRNA accumulation of either gene was recorded (data not shown). Because *P. ramosa* seeds were receptive to GR24 after a minimum 4 d conditioning period (Fig. 1.1A), the expression of *PrCYP707A1* and *PrCYP707A2* were examined in 6 h GR24-treated seeds after various conditioning periods (1, 3, 5, and 7 d) (Fig. 1.3). In seeds that underwent 1 d and 3 d of conditioning, GR24 triggered neither germination nor *PrCYP707A1* mRNA

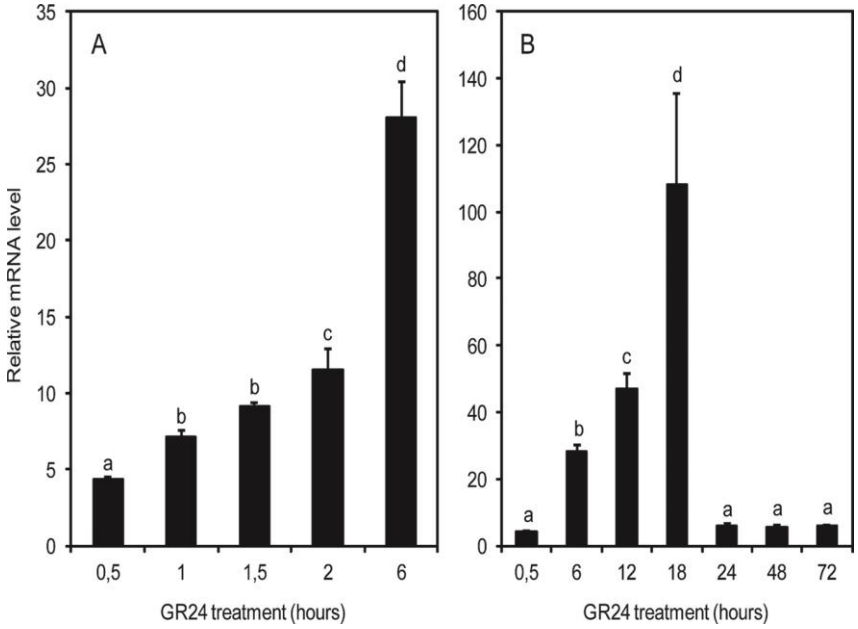


Fig. 1.2 Time-course of *PrCYP707A1* expression in 7 d conditioned seeds treated with 1 nM GR24.

(A) Time-course during a GR24 treatment of 6 h. (**B)** Time-course during a GR24 treatment of 3 d. Means are values ±SD (*n* = 6). Means denoted by the same letter do not differ significantly at *P* <0.05 (SNK test).

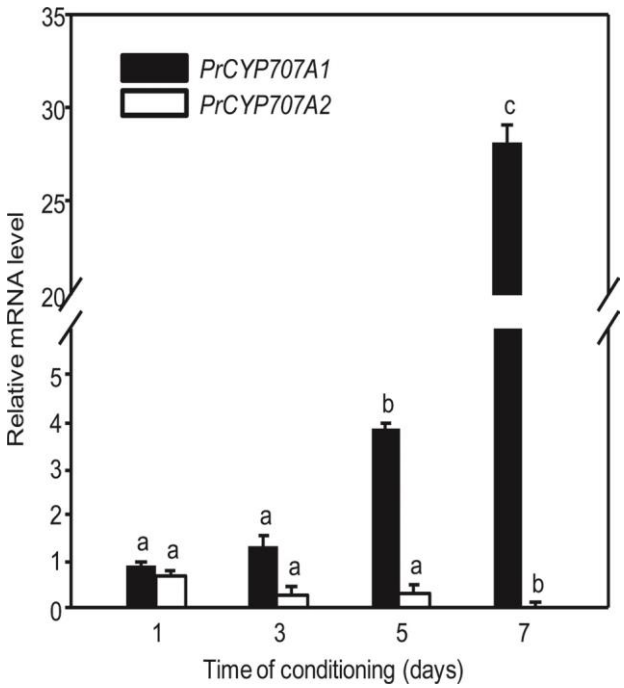


Fig. 1.3 Expression of *PrCYP707A1* and *PrCYP707A2* in seeds conditioned for 1, 3, 5 or 7 d and then treated for 6 h with 1 nM GR24.

Means are values ± SD (n = 6). For each gene, means denoted by the same letter do not differ significantly at *P* <0.05 (SNK test).

accumulation. By contrast, *PrCYP707A1* was significantly up-regulated in GR24stimulated seeds that were conditioned for 5 d and 7 d, with germination percentages of 72 ± 6% and 77 ± 2%, respectively. Whatever the conditioning period, *PrCYP707A2* did not exhibit any major change in its expression level.

GR24 induces PrCYP707A1 *mRNA accumulation in cells close to the micropyle*

Seeds strongly accumulated *PrCYP707A1* transcripts during the first 18 h of GR24 treatment (Fig. 1.2). *In situ* hybridization experiments were performed on longitudinal sections of 6 h GR24-treated seeds to localize this accumulation spatially (Fig. 1.4). To allow better visualization and identification of the different parts of 6 h GR24- treated seeds (cf. Joel *et al.*, 2011), a seed section was stained with toluidine blue (Fig. 1.4A).

Positive hybridization with the specific antisense probe indicated *PrCYP707A1* transcript accumulation (Fig. 1.4C, 1.4D), whereas no signal was observed after hybridization with the sense probe (Fig. 1.4B). In 7 d conditioned seeds, transcripts accumulated mainly in the embryo cells facing the micropyle (Fig. 1.4C). By contrast, *PrCYP707A1* mRNA accumulated markedly in the cells near the micropyle in 6 h GR24-treated seeds, whereas no staining was detected in the embryo cells (Fig. 1.4D). According to Joel *et al.* (2011), these stained cells may correspond to perisperm tissue. These results indicate that GR24 induced a change in the spatial localization of *PrCYP707A1* expression in seeds.

Change in seed ABA levels during conditioning and GR24 treatment

ABA levels in seeds were determined during the 7 d conditioning period and the following 3 d GR24 treatment. A 6.3fold decrease in ABA content occurred during the first day of conditioning (Fig. 1.5). Although no significant decrease was observed in seeds during the next 6 d of conditioning, a second, 8-fold drop in ABA content was observed specifically in 3 d GR24-treated seeds compared with 10 d conditioned seeds. Interestingly, this decline in ABA levels in GR24-treated seeds followed the up-regulation of *PrCYP707A1* occurring during the first 18 h of GR24 treatment (Fig.1. 2).

Abz-E1 and Abz-E2B inhibit GR24-triggered seed germination of P. ramosa

The preponderant role of ABA catabolism in the GR24dependent germination of *P. ramosa* seeds was confirmed by using two CYP707A inhibitors, Abz-E1 and Abz-E2B (Okazaki *et al.*, 2011, 2012). When 7 d conditioned seeds were treated for 3 d with 10^{-9} M GR24 together with Abz-E1 or Abz-E2B at various concentrations, seed germination was inhibited in a concentration-

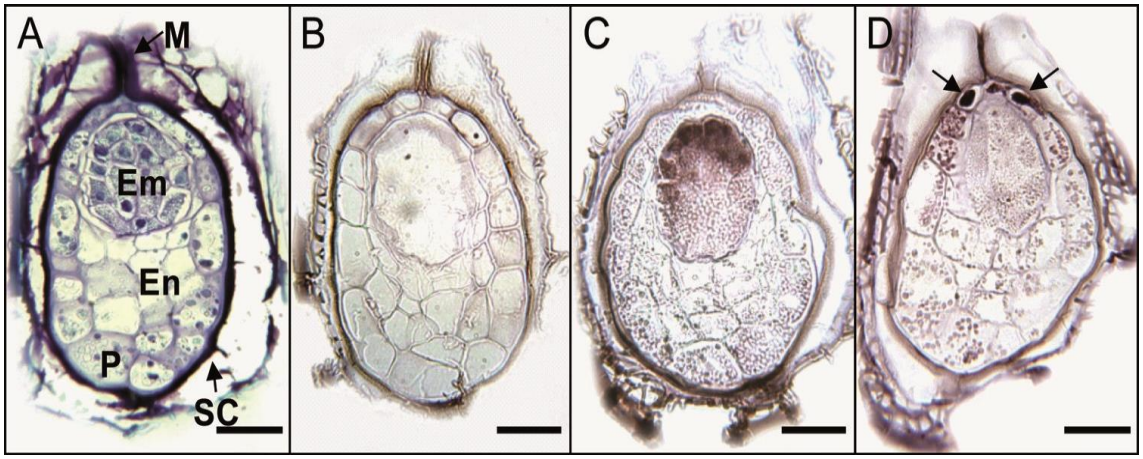


Fig. 1.4 *In situ* localization of *PrCYP707A1* transcripts in longitudinal sections of *P. ramosa* seeds.

(A) Section stained with toluidine blue for visualization of seed anatomy: M, micropyle; Em, embryo; En, endosperm; P, perisperm; SC, seed coat (Joel *et al.*, 2011). Seeds were conditioned for 7 d **(A, B, C)** and treated for 6 h with 1 nM GR24 **(D)**. Sections were hybridized with the sense probe as a negative control (B) and with the antisense probe **(C, D)**. Positive hybridization signals are indicated by brown-violet staining (arrows) using a digoxigenin-labelled RNA immunodetection system. Bars, 50 µm.

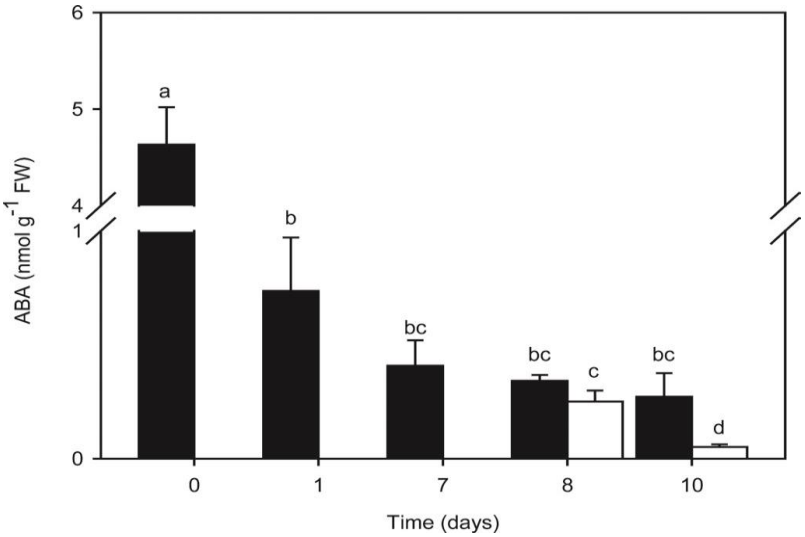


Fig. 1.5 Change in ABA levels during seed conditioning and GR24-triggered germination over time.

Seeds without GR24 treatment (black bars) and with 1 nM GR24 added on day 7 of conditioning (white bars). Means are values ± SE. Means denoted by the same letter do not differ significantly at $P < 0.05$ (SNK test).

dependent manner. Inhibition was maximal at 100 µM, 84 ± 5% and 90 ± 3% for Abz-E1 or Abz-E2B, respectively, with IC_{50} reaching 30 ± 16 µM and 17 ± 9 µM, respectively (data not shown). The most effective inhibitor, Abz-E2B was used for further experiments. Using GR24 concentrations ranging from 10^{-12} to 10^{-7} M with Abz-E2B concentrations ranging from 10^{-6} to 10^{-4} M, no GR24 concentration was able to overcome AbzE2B inhibition (Fig. 1.6A). IC_{50} values ranged insignificantly from 8.3 µM and 17 µM according to GR24 concentration (ANOVA, P = 0.877). Germination inhibition was total with 100 µM AbzE2B and 10^{-12} M GR24. Increasing concentrations of Abz-E2B did not significantly modify the EC_{50} of GR24 (values ranging from 0.9 nM to 11.3 nM; ANOVA, P = 0.181) (Fig. 1.6B). This indicates that Abz-E2B did not interfere with the perception of the germination stimulant. Significant reduction in the maximum germination percentage was observed with Abz-E2B concentrations of 5 µM or higher (ANOVA, $P < 0.001$). To ensure that the Abz-E2B inhibition of germination was not due to seed mortality, treated seeds were subsequently washed with distilled water and treated once again with GR24 in the absence of the inhibitor. Once washed, the seeds showed a germination rate similar to that of untreated seeds (data not shown).

Taken together, these results demonstrate that, with regarded germination, Abz-E2B acts as a non-competitive antagonist of GR24 with reversible inhibitory activity.

Discussion

Germination of obligate root parasitic plants is stimulated by the perception of secondary metabolites released from the roots of a potential host plant (Estabrook and Yoder, 1998). Among the germination stimulants identified so far, SLs have been the most extensively studied (Yoneyama *et al.*, 2010). In addition to their capacity to induce broomrape seed germination at nanomolar concentrations, SLs are host recognition signals for symbiotic arbuscular mycorrhizal fungi (Besserer *et al.*, 2006) and constitute new plant hormones that inhibit shoot branching (Gomez-Roldan *et al.*, 2008; Umehara *et al.*, 2008). Although much progress has been made on the signaling activities of SLs in non-parasitic plants, the signalling pathway triggered by SLs leading to broomrape seed germination remains unclear. Here, early transcriptome modifications of *P. ramosa* seeds triggered by a synthetic SL, the germination stimulant GR24, were studied using an AFLP-based transcript profiling procedure (Vuylsteke *et al.*, 2007). The overall results from the cDNA-AFLP experiments indicate that GR24 does not induce massive modification of the transcriptome because, among the 2500 TDFs visualized on gels, only 58 showed significant differential expression between the control and the 2 h and 6 h GR24-treated samples. Two of the most distinct TDFs, in terms of expression pattern and biologically significant association with

germination, corresponded to a *CYP707A* gene encoding an ABA 8'-hydroxylase (Table 1). Interestingly, an *AtCYP707A* gene has been already shown to be up-regulated in *Arabidopsis* seedlings treated with GR24 (Mashiguchi *et al.*, 2009). Based on both TDF sequences, a search in the Parasitic Plant Genome Project databank uncovered three distinct *CYP707A* sequences in *P. aegyptiaca* and *S. hermonthica*. RACE-PCR strategies revealed two *CYP707A* full-length cDNAs, named *PrCYP707A1* and *PrCYP707A2*.

ABA is known to play a major role in seed dormancy and germination (Koornneef *et al.*, 2002). Its hormonal action is controlled by a fine-tuned balance between biosynthesis and catabolism (Nambara and Marion-Poll, 2005). Seed dormancy maintenance involves ABA synthesis (Finkelstein *et al.*, 2008) whereas a decrease in ABA content triggered by after-ripening, stratification, and other dormancy-releasing mechanisms promote the germination process in dormant seeds (Gubler *et al.*, 2005). Thus, dormancy release relies mainly on ABA catabolism by specific ABA 8'-hydroxylases encoded by the cytochrome P450 CYP707A family (Kushiro *et al.*, 2004; Saito *et al.*, 2004; Okamoto *et al.*, 2006). ABA 8'-hydrolases catalyse ABA hydroxylation and produce 8'-hydroxy ABA which is then spontaneously isomerized to phaseic acid (Nambara and Marion-Poll, 2005). CYP707A-related sequences have been characterized in many plant species. For instance, four genes encoding CYP707A activity have been identified in *Arabidopsis* (Kushiro *et al.*, 2004; Saito *et al.*, 2004) and two in barley (Millar *et al.*, 2006). Among the four *Arabidopsis* sequences, *AtCYP707A2* is up-regulated in association with a rapid decrease in ABA content during seed imbibition. Seeds of a *cyp707a2* mutant were hyperdormant and accumulated 6-fold higher ABA levels than the wild type (Kushiro *et al.*, 2004; Millar *et al.*, 2006), whereas constitutive expression of *AtCYP707A1* in *Arabidopsis* results in decreased ABA levels in seeds along with dramatically reduced dormancy (Millar *et al.*, 2006). Similarly, ABA content in barley is higher in embryos of after-ripened dormant seeds than of non-dormant seeds in association with higher *HvCYP707A1* expression levels in non-dormant compared to dormant seeds (Millar *et al.*, 2006). Altogether, these results highlight the major role of *CYP707A* genes in regulating the ABA level during seed dormancy and release.

In root parasitic plants, the control of ABA levels is also thought to be involved in the seed germination process (Zehhar *et al.*, 2002; Chae *et al.*, 2004). In the present study, a strong decrease in ABA levels in *P. ramosa* seeds occurred during the first day of conditioning (Fig. 1.5). This decrease was maintained to a lesser extent for the next 6 d of conditioning. Interestingly, neither gene, *PrCYP707A1* nor *PrCYP707A2*, exhibited any change in their expression levels during the 7 d conditioning period (data not shown). Based on these results, the decrease in ABA levels in conditioned *P. ramosa* seeds does not seem to be associated with ABA catabolism, but rather with

ABA release in the medium as previously demonstrated in the 1 d conditioned seeds of *O. minor* (Chae *et al.*, 2004).

The present study shows that GR24 treatment, following conditioning, induced a second decrease in the ABA levels in seeds (Fig. 1.5). These results suggest that GR24 promotes a sufficient and necessary reduction in ABA content for *P. ramosa* seed germination. Accordingly, when exogenous ABA is applied during conditioning and GR24 treatments, germination of *P. ramosa* seeds is inhibited (Zehhar *et al.*, 2002). Here, the second ABA reduction in response to GR24 was associated with the strong and rapid up-regulation of *PrCYP707A1* that started as early as 1 h after the addition of GR24 and persisted with increasing intensity for 18 h (Fig. 1.2). By contrast, *PrCYP707A2* did not show any change in its expression during the 72 h GR24 treatment. These findings indicate that conditioned *P. ramosa* seeds can germinate only after endogenous ABA content reaches a sufficiently low level through CYP707A-dependent catabolism triggered by GR24. The important role of *CYP707A* genes in the regulation of ABA levels and dormancy release in response to environmental cues has already been investigated in non-parasitic plant: exogenous nitrate and light, two seed dormancy releasing stimuli in *Arabidopsis*, induce an up-regulation of *AtCYP707A2* (Seo *et al.*, 2006; Matakiadis *et al.*, 2009). A *PrCYP707A1*-dependent release of dormancy in *P. ramosa* seeds appears to rely on the perception of another environmental cue: the exogenous germination stimulant produced by the host plant. This primordial role of *CYP707A1* in *P. ramosa* seed germination was confirmed by the application of specific inhibitors of ABA 8'-hydroxylase, Abz-E1 and Abz-E2B (Okazaki *et al.*, 2011, 2012) on conditioned seeds together with GR24 (Fig. 1.6). These inhibitors prevented seed germination. Abz-E1 and Abz-E2B correspond to structural analogues of uniconazole, which has been shown to inhibit the germination of *P. ramosa*, *O. aegyptiaca*, and *O. minor* seeds when applied during conditioning (Zehhar *et al.*, 2002; Song *et al.*, 2005; Uematsu *et al.*, 2007). This study now provides evidence that uniconazole inhibited broomrape seed germination by inhibiting both gibberellin synthesis and ABA catabolism.

To be receptive to germination stimulants, broomrape seeds require a preparatory phase of several days called the conditioning period (Joel *et al.*, 1995b). The present study demonstrated that *P. ramosa* seeds require a minimum of 4 d of conditioning to allow optimal germination in response to GR24 (Fig. 1.1A). At first glance, this result contradicts a previous study that concluded that *P. aegyptiaca*, a closely related species, does not need conditioning to respond to germination stimulants (Plakhine *et al.*, 2009). However, non-conditioned *P. aegyptiaca* seeds stimulated by GR24 only germinate after 7 d, a period that may correspond to a 4 d conditioning period and a 3 d germination process, as reported for *P. ramosa* seeds here. This study showed

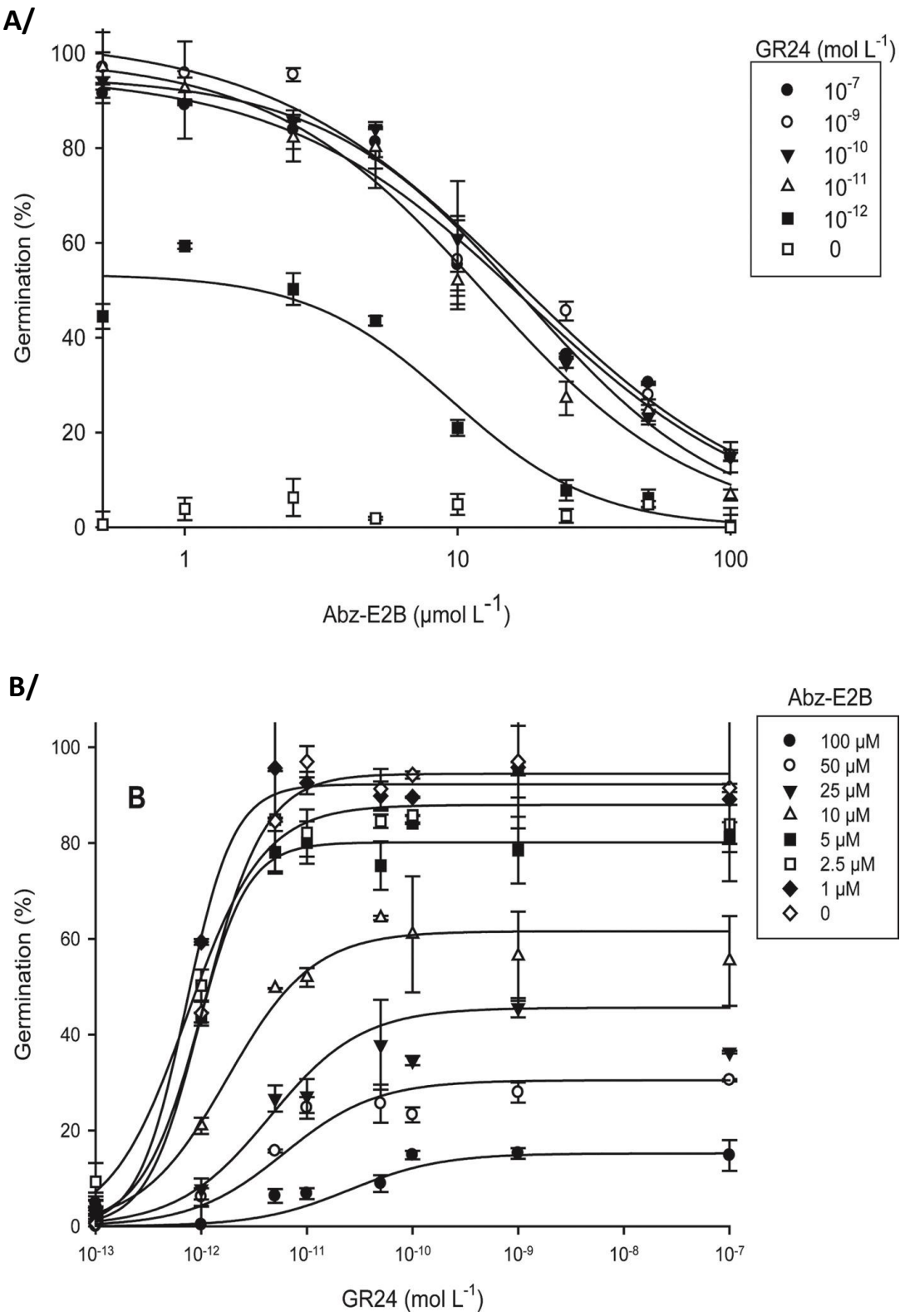


Fig. 1.6 Abz-E2B inhibition of *P. ramosa* seed germination.

(A) Abz-E2B IC_{50} curve of the concentration response of *P. ramosa* seed germination at different GR24 concentrations. **(B)** GR24 EC_{50} curve of the concentration response of *P. ramosa* seed germination at different Abz-E2B concentrations. All data are reported as means ± SE.

that the conditioning period starts with seed imbibition that takes around 1 h and optimal AEC (0.9) is reached as of first day of conditioning (Fig. 1.1B). This rapid imbibition is obtained by water entering the seed through the micropyle which opens after 30 min (Joel *et al.*, 2011). Thus, the inability of *P. ramosa* seeds to respond to GR24 during the first 4 d of conditioning cannot be attributed to a defect in seed hydration nor in energy status of the embryo. An analysis of the expression pattern of *PrCYP707A1* in seeds treated for 6 h with GR24 demonstrated that *PrCYP707A1* expression was not up-regulated until a conditioning period of 5 d or more (Fig. 1.3). Taken together, these results suggest that *P. ramosa* seeds do not have physical dormancy and that the minimal conditioning period may correspond to physiological processes resulting in the set-up of the machinery needed for GR24 perception and signalling leading to *PrCYP707A1* over-expression.

A recent study on the inheritance of the germination control in *P. aegyptiaca* seeds suggests that receptors of germination stimulants are located in the living perisperm cells beneath the micropyle (Plakhine *et al.*, 2012). The *in situ* hybridization experiments support this hypothesis since, upon GR24 treatment, *PrCYP707A1* mRNA accumulated rapidly and specifically in similar cells in *P. ramosa* seeds (Fig. 1.4). Moreover, such rapid accumulation triggered 1 h after GR24 application can be attributed to the location of these cells, which are readily accessible to the germination stimulant entering through the micropyle.

One question that remains is how the germination stimulant activates the signalling pathway leading to rapid transcriptional activation of the *PrCYP707A1* gene. Expression of *AtCYP707A2* has been shown to be regulated by exogenous nitrate, which releases seed dormancy in *Arabidopsis* (Matakiadis *et al.*, 2009). The nitrate control of seed dormancy is known to proceed via the production of nitric oxide (NO) (Bethke *et al.*, 2006). In this context, Liu *et al.* (2009, 2010) demonstrated in *Arabidopsis* that hydrogen peroxide (H_2O_2) and NO are involved in the up-regulation of the *AtCYP707A2* gene and the subsequent decrease in ABA levels during seed imbibition. Interestingly, the cDNA-AFLP procedure also identified two TDFs (44 and 49) putatively encoding a GST and a catalase in *P. ramosa* GR24-treated seeds, suggesting that oxidative stress may have occurred upon GR24 stimulation. The possible involvement of NO and H_2O_2 in SL signalling and *PrCYP707A1* activation, as well as the occurrence of oxidative stress during *P. ramosa* seed germination, are currently under investigation.

The cDNA-AFLP procedure proved to be a powerful tool to identify candidate genes involved in the response of *P. ramosa*, a non-model plant, to the germination stimulant GR24. In addition to *PrCYP707A1*, other revealed TDFs may correspond to genes putatively involved in this process (Table 1). For instance, the *Arabidopsis* genes similar to TDF11-39 and TDF36-50

encode heat shock proteins, HSP90 and HSC70, respectively, known to form a molecular complex that modulates ABA-dependent physiological responses such as stomatal closure and seed germination (Clément *et al.*, 2011). Interestingly, the *Arabidopsis* proteins peptidylprolyl isomerase ROF1 and ROF2, also called AtFKBP64 and AtFKBP65, corresponding to TDF8, have been shown to bind to HSP90 (Aviezer-Hagai *et al.*, 2007). Similarly, FK506 binding proteins (FKBP) are thought to play a major role in seed germination of sorghum (Sharma and Singh, 2003). Moreover, TDF7 may correspond to a member of a small plant-specific protein family, ABI five binding proteins (AFPs), which interact with the transcription factor ABA-insensitive5 (ABI5), a key regulator of ABA signalling and stress response in *Arabidopsis* seeds (Garcia *et al.*, 2008). Finally, TDF20 and TDF51 correspond to two sequences encoding a cinnamate 4-hydroxylase (C4H) and a phenyl ammonia lyase (PAL), respectively, involved in phenylpropanoid synthesis. In *Arabidopsis*, both *C4H* and *PAL2* genes have been shown to be transiently induced in seeds exposed to the germination stimulants karrikins identified in smoke from wildfires (Nelson *et al.*, 2010). Interestingly, karrikins and GR24 signalling require the same F-box protein MAX2 in *Arabidopsis* germination and shoot branching processes, respectively (Nelson *et al.*, 2011). Thus, all these putative candidate genes deserve further study to investigate their potential implication in *P. ramosa* seed germination.

In summary, GR24 triggered the dormancy release of *P. ramosa* seeds by activating a strong and rapid up-regulation of an ABA-catabolic gene *PrCYP707A1* that occurs in association with a reduction in ABA levels. However, release from dormancy was shown to require a minimum conditioning period since germination and the activation of *PrCYP707A1* expression only occurred 4 d post imbibition. The results on the spatial and temporal expression of *PrCYP707A1* corroborate previous studies suggesting that putative receptors of parasitic plant germination stimulants are effective following a conditioning period and are located in the cells between the embryo and the micropyle. How GR24 triggers the ABA decline leading to the *P. ramosa* seed germination requires further study, as does the possible implication of gibberellins since antagonism between ABA and GA plays a key role in controlling seed germination.

Acknowledgements

This work was supported financially by a PhD fellowship (to M-M. Lechat) and funds from the French Ministry of Education and Research.

2. Autres acteurs précoces impliqués dans la germination de *P. ramosa* en réponse au GR24

La cDNA-AFLP a permis de révéler d'autres TDF que *PrCYP707A1* comme correspondant à des gènes potentiellement surexprimés en réponse au GR24. Dans cette partie, l'étude des TDF11 et 39, des TDF 36 et 50, et du TDF8 (Tab. 1.1 Chap I), codant respectivement pour des protéines de choc thermique HSP90, HSC70 et une Rotamase 1 ROF1, est présentée. Les HSP sont des protéines chaperonnes qui catalysent des changements de conformation de leur protéines cibles afin d'en moduler leurs activités (Clément et *al.*, 2011). La protéine ROF1 est une protéine chaperonne qui possède de plus une activité peptidyl prolyl *cis-trans* isomérases impliquée dans le repliement des protéines et dans les interactions protéine-protéine (Aviezer-Hagai K et *al.*, 2007 ; Sharma et Singh, 2003).

Ces TDF ont plus spécifiquement été étudiés car il a été démontré, lors de la germination des graines de colza (*B. napus*), que les gènes codants des HSP90 étaient fortement exprimés (Ramachandra K. et *al.*, 1997). Or, chez *A. thaliana* les HSP90 sont connus pour former des complexes moléculaires avec les HSC70. Ces complexes permettent alors de moduler des réponses physiologiques ABA-dépendantes telles que la fermeture des stomates et la germination des graines (Clément et *al.*, 2011). De même, chez *A.thaliana* les protéines ROF1 et ROF2 (*AtFKBP64* et *AtFKBP65*) peuvent se lier aux HSP90 (Aviezer-Hagai et *al.*, 2007). Or, chez le sorgho les protéines ROF jouent également un rôle majeur dans la germination des graines (Sharma et Singh, 2003).

- *Obtention des ADNc PrHSC70.1, PrHSP81.1 et PrROF1*

Dans les bibliothèques d'EST de *P. aegyptiaca* (http://ppgp.huck.psu.edu/), 108 ESTs correspondant à des séquences putatives d'une HSC70, 25 pour des HSP90 (HSP81.1) et 3 pour des Rotamases 1 (ROF1) ont été identifiées. Sur la base de ces séquences, des expériences de RACE-PCR ont conduit à l'identification de trois séquences d'ADNc chez *P. ramosa* : *PrHSC70.1* (1712 pb), *PrHSP81.1* (2100 pb) et *PrROF1* (1716 pb) (Annexe 2). Les séquences d'acides aminés prédites de ces gènes ont révélé une identité de séquence élevée avec les orthologues d'*A. thaliana AtHSC70.1* (80%) (AT5G02500), *AtHSP81.2* (82%) (AT5G52640), et *AtROF1* (77%) (AT3G25230).

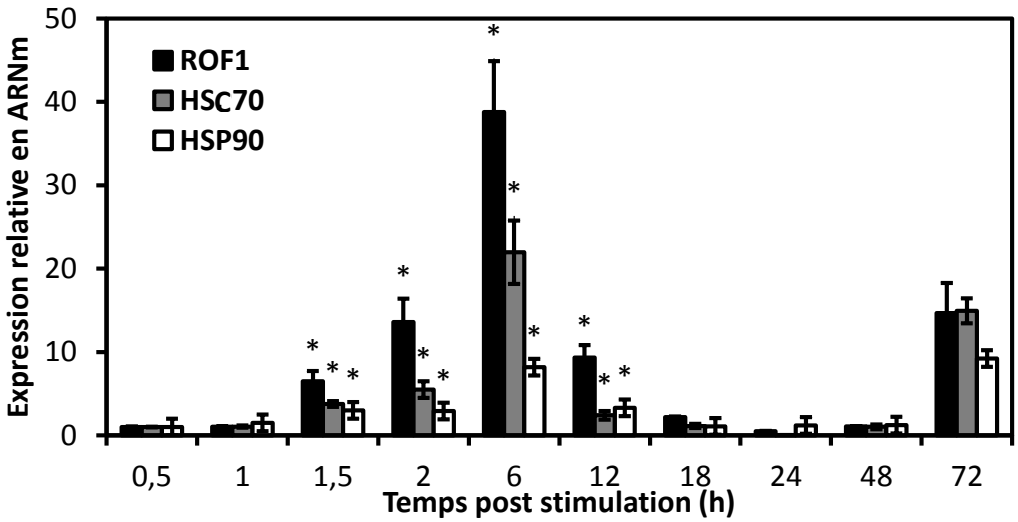


Fig. 1.7 Profils d'expression des gènes *PrHSC70, PrHSP90* et *PrROF1* dans les graines de *P. ramosa* en réponse au GR24.

Des graines conditionnées 7J sont traitées au GR24 1.10^{-9} M. Les expressions des gènes *PrROF1*, *PrHSC70* et *PrHSP90* sont ensuite suivies au cours du temps. Toutes les données sont présentées comme des moyennes ± SE, (n=3). Une étoile (*) montre une évolution significative du taux de transcrit en comparaison avec des graines non stimulées (SNK P <0,05) normalisé par l'expression du gène EF1-α. Primers utilisés : *PrROF1 Up* 5'TTTGATTCGAGCCGTGATA GG3' ; *PrROF1 Do* 5'AGGTCCCATCCCTTGATGACT3' ; *PrHSC70 Up* 5'TGCCTGTGAAA GGGCAAAG3'. *PrHSC70 Do* 5'AC CCTCATACAAAGAATCAATTTCAA3' ; *PrHSP90 Up* 5'CGACAAAGCATAACGATGATGAAC3' ; *PrHS90 Do* 5'GCCTAGGTTTTCACCAGATG TATCTC3'. Les protocoles de conditionnement, de germination et de RT-PCR sont réalisés selon Lechat et *al.*, 2012 (Chap I).

A/ **B/**

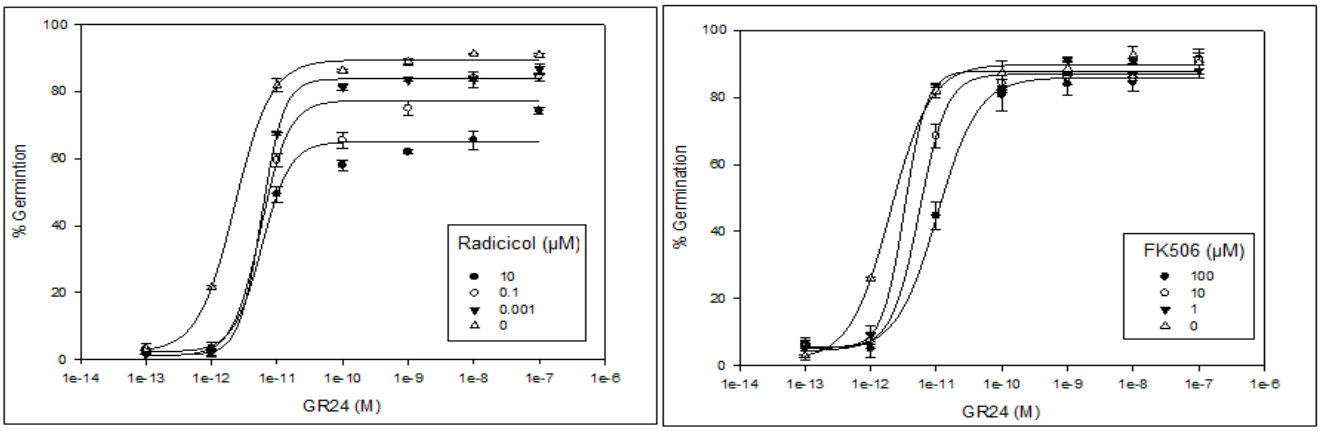


Fig. 1.8 Inhibitions de la germination des graines *P. ramosa* par le Radicicol et le FK 506.

Des graines conditionnées 7J sont traitées de manières conjointes avec GR24 de 1.10^{-7} à 1.10^{-13} M et, du Radicicol (**A**) ou du FK506 (**B**) pour des concentrations allant de 0.001 à 10 µM pour le Radicicol et de 1 à 100 µM pour le FK506. Les taux de germination sont déterminés 3J post traitement. Toutes les données sont présentées comme des moyennes ± SE, (n=3, SNK P <0,05). Le protocole de conditionnement et de germination sont réalisés selon Lechat et *al.*, 2012 (Chap I).

- *Validation par RT-PCR de la surexpression de ces gènes en réponse au GR24*

Les profils d'expression de ces différents gènes, *PrHSP70.1*, *PrHSP81.1* et *PrROF1* ont été suivis pendant 2 jours après traitement au GR24 (Fig. 1.7). Ils présentent une augmentation significative de leurs expressions après 1 h 30 et un pic d'accumulation des transcrits atteint au bout de 6 h. Après 12 h, les niveaux d'ARNm chutent pour retourner à leur niveau basal observé dans les 30 premières minutes, et restent stables les 36 h suivantes. Les profils d'expression de ces gènes sont similaires à celui de *PrCYP707A1* (Fig. 1.2, Chap I) mais avec un décalage temporel, leurs surexpressions sont plus tardives d'au moins 30 min.

- *Validation pharmacologique de l'implication des protéines HSC70, HSP90 et ROF1 dans la germination de* P. ramosa *en réponse au GR24*

La surexpression de ces gènes après 6 h de traitement au GR24 suggère l'implication des protéines codées par ces gènes dans la germination des graines de *P. ramosa*. Afin de valider leurs implications dans ce processus, deux inhibiteurs ont été testés. D'une part le Radicicol, inhibiteur des HSP qui se fixe au niveau N-terminal ATP/ADP-binding de ces dernières (Schulte et *al.,* 1999). Et d'autre part le FK 506, inhibiteur des Rotamases, se fixant sur le site actif de l'enzyme (Sharma et Singh, 2003).

Dans le cas du Radicicol, l'inhibition de la germination en réponse au GR24 est maximale pour une dose de 10 µM. Le Radicicol ne modifie pas l'EC_{50} du GR24 vis-à-vis de la germination, mais diminue faiblement le pourcentage de germination maximum, de l'ordre de 25% ± 3% (Fig. 1.8A). L'IC_{50} du Radicicol n'a cependant pas été extrapolé car l'inhibition maximale de la germination qu'il provoque est trop éloignée des 50%. Une approche similaire a été utilisée pour tester l'effet du FK 506. Un maximum d'inhibition (45 ± 7%) est observé à des concentrations respectives de 100 µM en FK506 et 1.10^{-11} M en GR24 (Fig. 1.8B). A des concentrations élevées en GR24 ($>10^{-10}$ M), le FK 506 ne provoque pas d'inhibition de la germination contrairement au Radicicol, l'inhibition provoquée par le FK506 est donc faible. L'IC_{50} du FK 506 a pu être déterminé à 80 ± 20 µM. Les concentrations croissantes en FK 506 modifient l'EC_{50} du GR24 passant alors de $1,10^{-12} \pm 5,10^{-13}$ M à $1.10^{-11} \pm 7,10^{-12}$ M. L'effet antagoniste du FK 506 provoque donc une augmentation de l'EC_{50} du GR24.

Dans ces deux cas, le Radicicol et le FK 506, pour des concentrations en stimulant supérieur à 10^{-10} M, présentent de faibles activités inhibitrices sur la germination. La question d'une synergie entre les deux systèmes HSP et ROF1 est alors posée. Les deux inhibiteurs ont donc été testés simultanément pour une concentration en GR24 de 10^{-11} M, à laquelle l'effet de

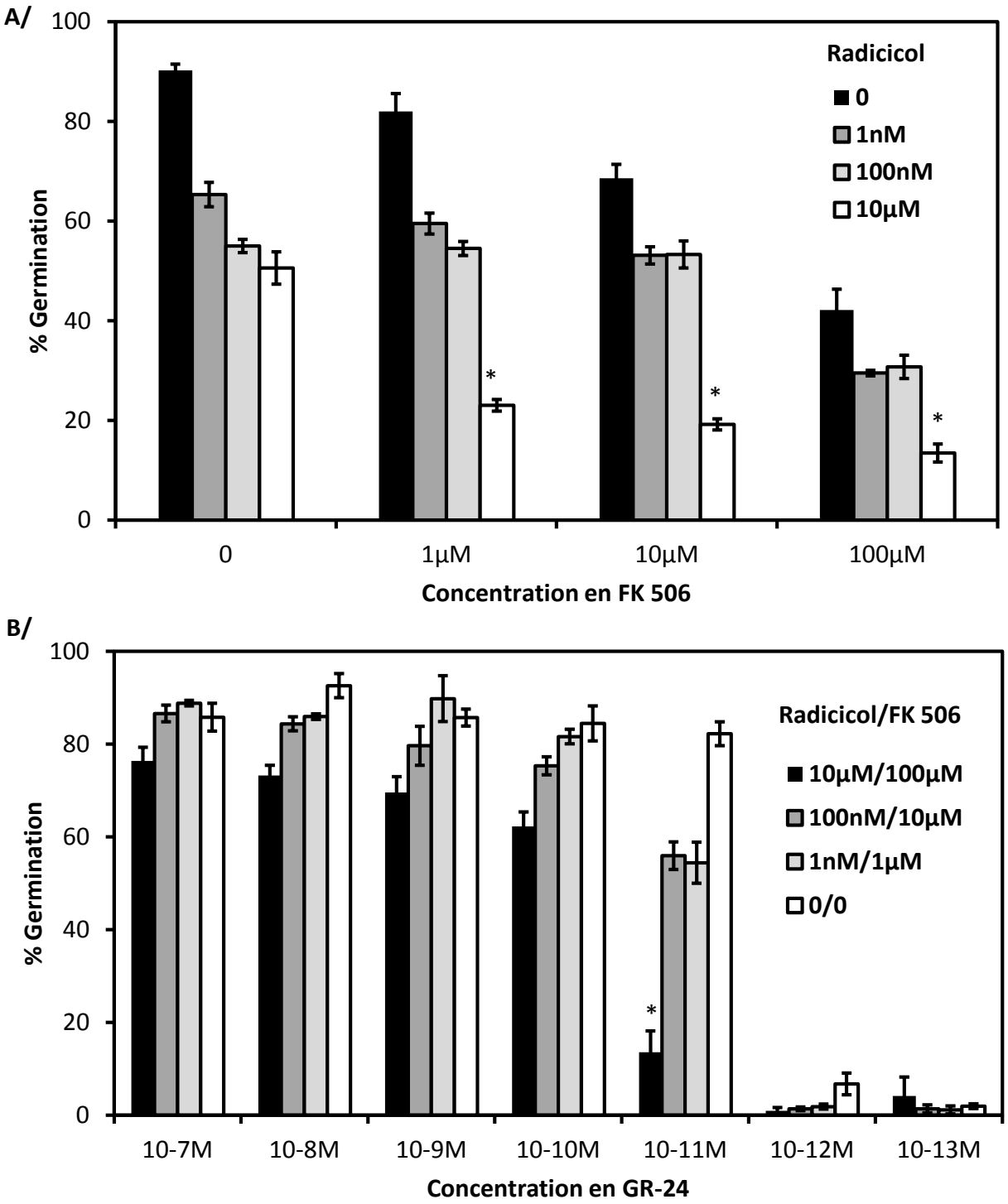


Fig. 1.9 Inhibitions de la germination des graines de *P. ramosa* par un traitement conjoint Radicicol/FK506 en fonction de la concentration en GR24.

Germination des graines de *P. ramosa* à différents couples de concentrations en Radicicol et FK 506, **(A)** pour une concentration en GR24 de 1.10^{-11} M, **(B)** pour des concentrations croissantes en GR24. Les graines ont été conditionnées 7J avant traitements. Toutes les données sont présentées comme des moyennes ± SE (n=3). Une étoile (*) montre un effet synergique significativement différent de l'effet de l'inhibiteur seul (SNK $P<0.05$). Le protocole de conditionnement et de germination sont réalisés selon Lechat et *al.*, 2012 (Chap I).

ces derniers est le plus marquant. Le maximum d'inhibition (75% ± 4%) est obtenu pour des concentrations respectives en Radicicol et en FK 506 de 10 et 100 µM (Fig. 1.9A). Ces résultats montrent un effet synergique des deux inhibiteurs. Afin de confirmer cet effet, des couples de concentrations en FK 506 et Radicicol sont testés pour des concentrations croissantes en GR24 (Fig. 1.9B). Des concentrations en GR24 supérieures à 1.10^{-11} M annulent l'inhibition générée par ces deux composés.

- *HSC70, HSP90 et ROF1 : acteurs minoritaires dans la germination des graines de* P. ramosa

Les résultats obtenus lors de ces expérimentations confirment la surexpression des gènes *PrHSC70.1*, *PrHSP81.1*, et *PrROF1*, observée précédemment lors de la cDNA-AFLP au cours de la germination précoce de *P. ramosa* en réponse au GR24.

Ces résultats concordent avec la surexpression du gène HSP90 observée lors de la germination de *B. napus* (Ramachandra et *al.*, 1997). Par ailleurs, nous avons démontré que ces acteurs sont capables de promouvoir la germination de *P. ramosa* et qu'ils agissent en synergie au cours de ce processus. Cette observation est en accord avec une précédente étude réalisée chez *A. thaliana* démontrant la liaison entre les HSP90 et les Rotamases ROF1 et ROF2 (Aviezer-Hagai et *al.*, 2007). Cependant, et contrairement à la germination du Sorgho (Sharma et Singh, 2003), les inhibiteurs pharmacologique de ces protéines ne provoque qu'une inhibition partielle de la germination de *P. ramosa* en réponse au GR24. De plus, l'inhibition générée par le FK506 seul ou en simultané avec le Radicicol peut être surmontée par des doses croissantes en GR24. Ces résultats impliquent alors que la voie de signalisation mettant en jeu les HSP et ROF1 ne semble pas être une voie majoritaire dans le processus de germination des graines de *P. ramosa*. Leurs actions semblent permettre une modulation de la germination induite par le GR24 en réponse à de faibles concentrations en stimulant ($>10^{-10}$ M).

Chez *A. thaliana*, le complexe HSP90-HSC70 permet de moduler des réponses physiologiques ABA-dépendantes au cours de la germination des graines (Clément et *al.*, 2011). Au cours de la germination, les mutants *Athsc70-2.1* et *Athsp90.2* présentent une hypersensibilité à l'ABA (Clément et *al.*, 2011). Or, il a été démontré précédemment que la germination de *P. ramosa* est sous la dépendance du catabolisme de l'ABA. Les résultats obtenus suggèrent alors que les protéines *PrHSP70.1*, *PrHSP81.1* et *PrROF1* participent à diminuer la sensibilité à l'ABA, alors que *PrCYP707A1* permet de le cataboliser. On peut donc formuler l'hypothèse que dans le cas d'une faible concentration en stimulant ce serait cette

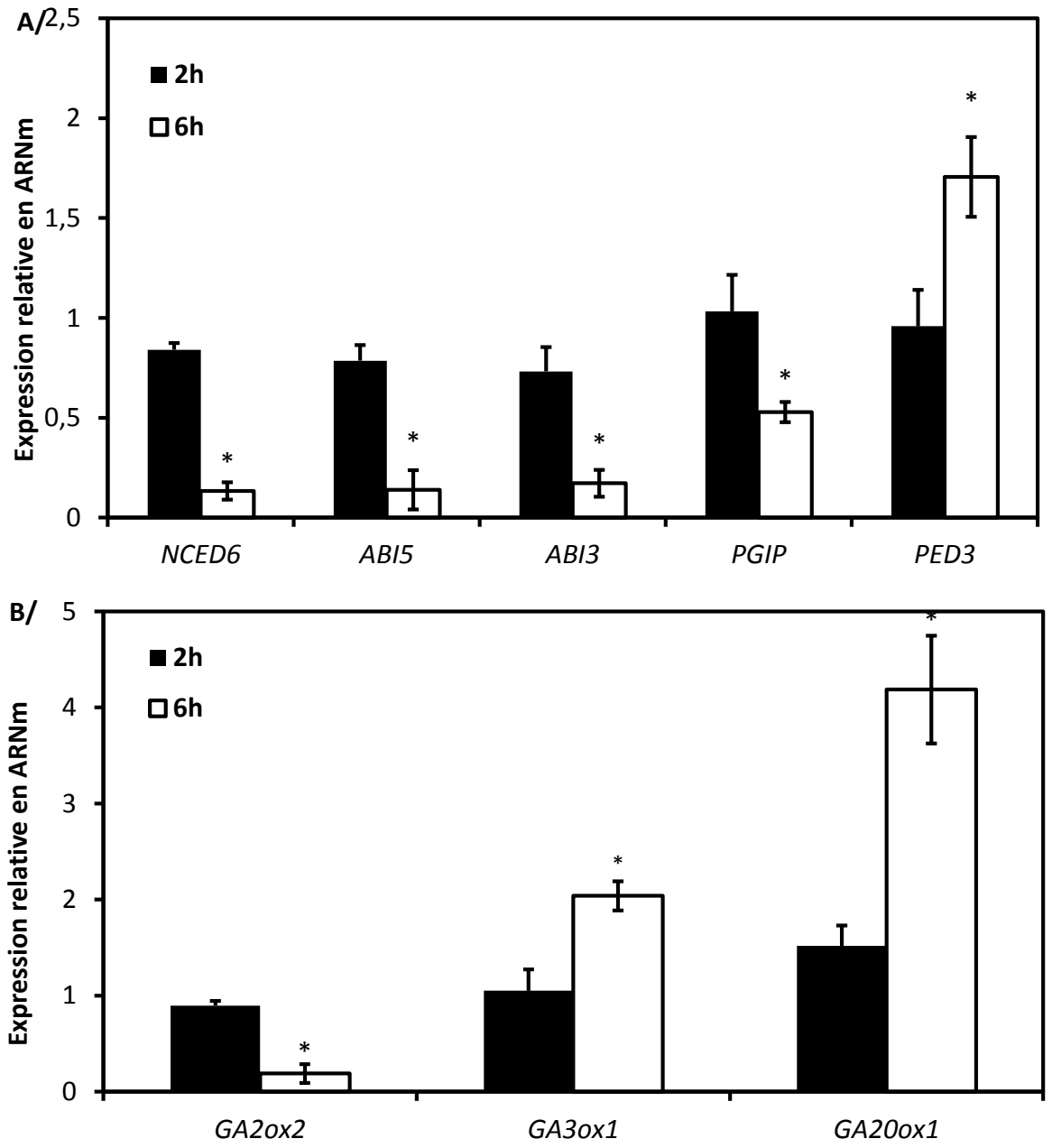


Fig. 1.10 Profil d'expression des gènes marqueurs de la biosynthèse et de la signalisation de l'ABA et des GA au cours de la germination de *P. ramosa* en réponse au GR24.

Les graines ont été conditionnées 7J avant d'être stimulées avec du GR24 1.10^{-9} M durant 2 h et 6 h. Toutes les données sont présentées comme des moyennes ± SE (n=3). Une étoile (*) montre une évolution significative du taux de transcrit en comparaison avec des graines non stimulées, (SNK P<0,05) normalisé par l'expression du gène EF1-α. Primers utilisés : *PrPED3 Up* 5' GAAATGGCTGTTTGGTATAATAGATGAC3' ; *PrPED3 Do* 5'AACAAGCTCAATCCCCAGGTT3' ; *PrABI5 Up* 5'CCGGGATAGTAAGGGAGCATAA3' ; *PrABI5 Do* 5'TTAATGCCAGTGTTACGTTGCAT3' ; *PrPGIP Up* 5'TCTCGACGGTCTAAGGTTGGA3' ; *PrPGIP Do* 5'GGGACAGATCCCCAAACGA3' ; *PrGA3OX1 Up* 5' GGACTCAACCATCCTCACGA3 *PrGA3OX1 Do* 5' TGACGGGTCCTGTTCACCAC3' ; *PrGA20OX1 Up* 5' CCAAATGAACTGGTGGAC3' ; *PrGA20OX1 Do* 5' ATATCAGCCCTGTAATGCT3' ; *PrGA2OX2 Up* 5' TACTACATGGGTCTCAGTCC3' ; *PrGA2OX2 Do* 5' TTCACACTCTTATACCTTCC3'. Les protocoles de conditionnement, de germination et de RT-PCR sont réalisés selon Lechat et *al.,* 2012 (chap I).

diminution de la sensibilité à l'ABA qui favoriserait la germination des graines de *P. ramosa*.

3. Évolution de l'expression de gènes marqueurs de l'équilibre hormonal ABA/GA dans la germination de *P. ramosa* en réponse au GR24

La dormance et la germination des graines de nombreuses espèces est en partie régulée par l'équilibre hormonal ABA/GA. Les résultats obtenus et publiés précédemment confirment le rôle prépondérant du catabolisme et de la chute du niveau d'ABA dans la levée de dormance et la germination stimulant dépendante de *P. ramosa*.

Afin de compléter les données déjà obtenues, les modifications potentielles de l'expression de plusieurs gènes marqueurs impliqués dans l'équilibre hormonal ABA/GA ont été suivies (Fig. 1.10). Pour la voie de l'ABA, cinq gènes ont ainsi été étudiés. Parmi ces cinq gènes, un code pour un marqueur de levée de dormance et de germination (*PED3*) (Dave et *al.*, 2011, Kanai et *al.*, 2010), et quatre sont des gènes marqueurs du maintien en dormance : un gène de la biosynthèse de l'ABA (*NCED6*), deux gènes impliqués dans la transduction du signal ABA (*ABI3* et *ABI5*), dont les expressions sont sous le contrôle des niveaux d'ABA, et un gène cible du regulon ABI3 (*PGIP*) (Kanai et *al.*, 2010 ; Liu et *al.*, 2010 ; Mönke 2012). En ce qui concerne les GA, trois gènes marqueurs impliqués dans la biosynthèse (*GA20ox1* et *GA3ox1*) et le catabolisme (*GA2ox2*) ont également été étudiés (Yamaguchi et *al.*, 2008).

Deux heures après l'ajout de GR24, aucun des gènes *PrNCED6*, *PrABI3*, *PrABI5*, *PrPGIP*, et *PrPED3* ne montre une évolution significative du taux de transcrit par rapport à des graines non stimulées (Fig. 1.10A). En comparaison, le gène *PrCYP707A1* est surexprimé dès 30 min après ajout de GR24. Cependant, 6 h après ajout de GR24, les profils d'expression de ces gènes montrent une évolution significative. Les gènes *PrNCED6*, *PrABI3* et *PrABI5* sont alors 6 fois moins exprimés, le gène *PrPGIP* 2 fois moins exprimé et le gène *PrPED3* 2 fois plus exprimé que dans des graines non stimulées. De manière similaire aux gènes précédemment étudiés, aucun des gènes *PrGA2ox2*, *PrGA20ox1*, et *PrGA3ox1* ne montrent de modifications significatives de leur expression 2 h post traitement (Fig. 1.10B). En revanche, 6 h après le début du traitement, le gène *PrGA2ox2* présente une forte chute du taux de transcrits d'un facteur 5. Au contraire, les gènes *PrGA3ox1* et *PrGA20ox1* montrent une augmentation du taux de transcrits de l'ordre de 2 et 4 fois respectivement.

Ces résultats permettent de compléter ceux déjà publiés au niveau du catabolisme de l'ABA. Ainsi, suite à la surexpression stimulant-dépendante du gène de catabolisme de l'ABA, *PrCYP707A1*, une chute du taux de transcrit des gènes sous contrôle des niveaux d'ABA (*ABI3*,

ABI5 et *PGIP*) est observée après 6 h. Parallèlement, le gène *PED3*, marqueur de sortie de dormance et de germination, est surexprimé après 6 h. De manière concomitante à la chute du taux de transcrit des gènes lié à la biosynthèse et à la signalisation de l'ABA, les gènes de biosynthèse des GA (*GA3ox1*, et *GA20ox1*) sont surexprimés.

Ces gènes montrent alors des profils d'expression similaires à ceux d'A. *thaliana* au cours de la germination (Finkelstein et Lynch, 2000 ; Kanai et *al.*, 2011 ; Mitchum et *al.*, 2006 ; Liu et *al.*, 2010 ; Yamaguchi et *al.*, 2008 ; Seo et *al.*, 2006). L'ensemble des résultats suggère qu'au cours de la germination de *P. ramosa* le ratio ABA/GA devient faible. Or, un faible ratio ABA/GA favorise la germination chez de nombreuses espèces (Rodriguez-Garcio et *al.*, 2009). En outre, l'application d'inhibiteurs de la voie de biosynthèse des GA durant la période de conditionnement inhibe la germination (Uematsu et *al.*, 2007 ; Zehhar et *al.*, 2002). Ce qui confirme la nécessité de la présence des GA au cours du processus de germination de *P. ramosa*. Cependant, l'ajout de GA post conditionnement ne suffit pas à déclencher la germination de *P. ramosa* (Song *et al.*, 2005; Uematsu *et al.*, 2007).

Conclusion

L'étude réalisée a permis de mettre en évidence différents processus lors de la germination de notre modèle d'étude *Phelipanche ramosa*. Ainsi, *P. ramosa* nécessite une période minimale de conditionnement de 4 jours avant d'être apte à germer en réponse aux stimulants de germination. L'incapacité des graines à germer durant cette période n'est cependant dû ni à un défaut d'hydratation, ni à un défaut de la charge énergétique, tous deux optimaux après une journée. L'accomplissement de ces deux processus, bien que nécessaires, n'est donc pas responsable de l'inaptitude des graines à germer en réponse aux stimulants de germination durant la période de conditionnement.

Une fois le conditionnement achevé et suite à la perception du GR24, le gène *PrCYP707A1* codant, une ABA-8'hydroxylase, est fortement surexprimé après 30 minutes. Cette enzyme permet une diminution des niveaux d'ABA détectée après 3 jours, permettant alors la levée de dormance. Les gènes codant cette enzyme sont également exprimés dans les processus de germination suite à l'imbibition (*AtCYP707A1* et *AtCYP707A2*) (Kushiro et *al.*, 2004 ; Millar et *al.*, 2006) et en réponse au GR24 chez les plantules d'*A. thaliana* (*AtCYP707A3*) (Mashiguchi et *al.*, 2009). Un pas supplémentaire a également été fait au niveau

de la localisation putative des récepteurs aux SL, par la mise en évidence des transcrits *PrCYP707A1* au niveau de cellules situées justes sous le micropyle.

En parallèle de l'activation de *PrCYP707A1*, une surexpression des gènes *PrHSP70.1*, *PrHSP81.1* et *PrROF1* codant pour des protéines chaperonnes est observée au bout de 1h30. Ces protéines sont impliqués dans les mécanismes de germination d'autres plantes (Ramachandra K. et *al.,* 1997 ; Sharma et Singh, 2003 ; Clément et *al.,* 2011), et dans des réponses physiologiques ABA dépendantes, notamment en réduisant la sensibilité à l'ABA au cours de la germination chez *A. thaliana* (Clément et *al.,* 2011). Chez *P. ramosa*, leurs inhibitions pharmacologiques entrainent une inhibition de la germination uniquement pour de faibles concentrations en GR24. Il en a été déduit que ces protéines étaient alors impliquées dans le processus de germination de *P. ramosa* en réponse à de faibles concentrations en GR24, en réduisant vraisemblablement la sensibilité à l'ABA.

De manière plus tardive, 6 h post stimulation, l'expression des gènes marqueurs de l'équilibre hormonal ABA/GA présente également des évolutions. Le gène *NCED6* de biosynthèse de l'ABA, ainsi que les gènes *ABI3* et *ABI4* de la voie de signalisation de l'ABA sont sous exprimés en comparaison avec des graines non stimulées. De manière corrélée, le gène *PGIP* possédant des motifs de réponse à ABI5 – dont l'expression est ABA dépendante et qui peut être régulé par l'action du gène *PED3* – se retrouve également sous exprimé. Parallèlement à l'inhibition de la voie de biosynthèse et de signalisation de l'ABA, une surexpression des gènes de la voie de biosynthèse des GA, *Ga3ox1* et *GA20ox1*, couplée à une inhibition du gène *GA2ox2* du catabolisme des GA est observée.

Les processus de germination post stimulation de *P. ramosa* montre de fortes similarités avec les événements qui se produisent lors de la germination d'*A. thaliana*. Étant donné ce constat et le fait que les SL soient des phytohormones présentes chez la majorité des plantes terrestres (Delaux et *al.,* 2012), l'existence d'une voie de signalisation SL commune aboutissant à l'activation des gènes *CYP707A* au sein des Orobanchaceae et des plantes non parasites peut alors être envisagée.

Chapitre 2

L'expression d'un gène de catabolisme de l'ABA, *CYP707A*, en réponse aux stimulants de germination, est conservée dans les graines de plantes parasites et non parasites.

1-Introduction

La famille des *Orobanchaceae* est composée de plantes parasites nuisibles, causant d'importants dégâts en termes de rendement sur leurs plantes hôtes, avant même leur émergence du sol. Les plantes parasites appartenant aux *Orobanchaceae* sont toutes des plantes parasites de racine (épirhizes), présentant un degré variable de dépendance vis-à-vis de l'hôte. Certaines sont des hémiparasites pouvant être facultatifs ou obligatoires comme *Triphysaria* et *Striga* spp., respectivement, alors que d'autres sont des holoparasites obligatoires tels que les *Orobanche* et les *Phelipanche* spp. Alors que les hémiparasites sont des organismes photosynthétiques, les holoparasites sont des organismes achlorophylliens non photosynthétiques dépendant entièrement de leur hôte quant à leur approvisionnement en eau et en nutriments.

Au sein du phylum des *Orobanchaceae*, une gradation de la dépendance au parasitisme suit la spéciation (Westwood *et al.* 2010). L'organe de fixation et de prélèvement des nutriments de l'hôte, l'*haustorium*, est un caractère homologue de ce clade et primordial à la relation parasitaire. Il évolue de facultatif et latéral chez *Tryphisaria*, à obligatoire et terminal au sein des genres *Striga*, *Orobanche* et *Phelipanche*, notamment. Malgré les spécifications trophiques entre les hémiparasites et les holoparasites, toutes les *Orobanchaceae* parasites obligatoires présentent un mécanisme de germination dépendant d'un stimulant de germination (SG) contrairement aux parasites facultatifs. Comme pour toutes les plantes, leur germination commence par l'imbibition de la graine et se termine par la protrusion de la radicule hors des couches protectrices de l'embryon (Finch-Savage et Leubner-Metzger, 2006). Cependant, pour terminer ce processus, les graines des plantes parasites obligatoires nécessitent la perception d'un SG, émis dans la rhizosphère par les racines de la plante hôte. La plupart des stimulants identifiés à ce jour appartiennent à la famille des strigolactones (SL) et correspondent à des molécules de signalisation de type buténolide (Yoneyama et *al.*, 2010). D'autres types de stimulants ont cependant été identifiés comme les sesquiterpènes lactone, les polyphénols, et les isothiocyanates, impliqués respectivement dans la stimulation de la germination de *O. cumana* (Joel et *al.*, 2011 ; Raupp et Spring 2013), *O. foetida* (Evidente et *al.*, 2010), et *P. ramosa* (Auger et *al.*, 2012). Cette dépendance à une molécule stimulant la germination est un aspect de la spécialisation du cycle de vie particulier des plantes parasites assurant une germination à proximité d'un hôte potentiel. Les plantes parasites non obligatoires telles que *Triphysaria* spp. ne nécessitent généralement pas ce signal de germination. Certaines études ont cependant démontré que le GR24, un analogue de synthèse des SL, est capable d'améliorer la

germination des graines d'*Arabidopsis thaliana*, dans certaines conditions défavorables à la germination. C'est le cas de graines en dormance primaire (Nelson et *al.*, 2009 ; Stanga et *al.*, 2013) ou soumise à une thermoinhibition (Toh et *al.*, 2012.). En outre, une nouvelle classe de molécules de type buténolide, les karrikines (KARs), ont été démontrées comme capables de stimuler la germination des graines des plantes non parasites (Nelson et *al.*, 2009, Dixon et *al.*, 2009). Les karrikines sont présentes dans les fumées issues de la combustion des matières végétales et sont connues pour favoriser la germination d'au moins 1200 espèces appartenant à plus de 80 genres (Dixon et *al.*, 2009), dont *A. thaliana* (Flematti *al.*, 2010). Il a été montré chez *A. thaliana* que les KARs et les SL partagent la même voie de signalisation dépendante de la protéine MAX2 à domaine F-box (Nelson et *al.*, 2011).

Alors que les SL ont été découverts il y a plus de cinq décennies (Cook et *al.*, 1966), les évènements moléculaires précoces déclenchés par les SG au cours de la germination des plantes parasites sont encore méconnus. Récemment, Lechat et collaborateurs (2012) ont démontré que *PrCYP707A1*, un gène codant une ABA 8'-hydroxylase, était un composant clé de la germination des graines de *P. ramosa* en réponse au GR24. En effet, l'application de GR24 déclenche une forte surexpression du gène *PrCYP707A1* au cours des premières 18h, suivie par une chute de 8 fois des niveaux d'ABA, détectable 3J après la stimulation. Un traitement concomitant des graines avec du GR24 et de l'Abz-E2B (un inhibiteur spécifique des CYP707A) provoque une inhibition de la germination. Ces résultats mettent en évidence le rôle essentiel du catabolisme de l'ABA médié par l'activation GR24-dépendante du gène *PrCYP707A1* dans le processus de levée de dormance de *P. ramosa*. Le catabolisme de l'ABA est déjà connu pour être impliqué dans la levée de dormance des graines de plusieurs plantes non parasites (Nambara et Marion-Poll, 2005). Ainsi, chez *A. thaliana*, la levée de dormance est également la résultante du catabolisme de l'ABA médié par l'action spécifique d'une ABA 8'-hydroxylase codée par le gène *AtCYP707A2*, qui est fortement surexprimé en association avec une diminution rapide de la teneur en ABA au cours de l'imbibition (Kushiro et *al.*, 2004 ; Saito et *al.*, 2004 ; Okamoto et *al.*, 2006). Alors que les graines du mutant *cyp707a2* sont hyper-dormantes et accumulent des niveaux 6 fois plus élevés en ABA que le type sauvage, les graines présentant une expression constitutive du gène *AtCYP707A1* ont des niveaux d'ABA très faible et une dormance drastiquement réduite (Kushiro et *al.*, 2004 ; Millar et *al.*, 2006). Enfin, l'Abz-E2B présente également une activité inhibitrice sur la germination des graines d'*A. thaliana* (Okazaki et *al.*, 2011).

Dans cette étude, nous avons examiné si le catabolisme de l'ABA médié par les CYP707A constitue un mécanisme conservé dans la réponse des graines de différentes espèces, à différents

stimulants de germination (GR24, DCL, 2-PEITC et KAR1). Nous avons étudié cette réponse chez des plantes parasites obligatoires (*P. ramosa*, *O. cumana*, *O. minor*, *S. hermonthica*) ou facultatives (*T. versicolor*), ainsi que chez une plante non parasite (*A. thaliana*). En raison de l'absence de mutants chez les *Orobanchaceae*, nous avons également utilisé *A. thaliana* comme outil afin d'étudier la voie de signalisation des SG menant à la surexpression des gènes *CYP707A*. Nous avons donc analysé l'expression des quatre gènes *AtCYP707A* d'*A. thaliana* en réponse aux SG dans des conditions dans lesquelles les SL peuvent améliorer la germination. La comparaison des réponses entre le type sauvage et le mutant *max2* a ensuite été réalisée afin de tester l'implication possible de la protéine MAX2 dans l'induction SG dépendante des gènes *AtCYP707A*.

2-Materiels et méthodes

2-1 Matériel végétal

Les graines de *P. ramosa* ont été collectées sur du colza (*Brassica napus*) parasité, à Saint-Jean d'Angély, en France en 2012. Les graines de *O. cumana* ont été collectées sur des tournesols (*Helianthus annuus* L.) parasités, à Longeville sur-Mer, en France en 2009. Les graines de *O. minor* ont été collectées sur du trèfle rouge (*Trifolium pratense*) parasité, à Utsunomiya, au Japon en 2009. Les graines de *S. hermonthica* ont été collectées sur du sorgho (*Sorghum bicolor*) parasité, à Al Gadarif, au Soudan en 1999. Les graines de *T. versicolor* ont été collectées à Napa, aux USA en 2009, et gracieusement fournit par le Pr Yoder (Université de Californie, USA). Les graines sont stockées au noir à 25°C avant utilisation, sauf pour *T. versicolor* dont les graines sont conservées à température ambiante.

Les graines d'*A. thaliana* écotype Col-O WT, et Col-O *max2.1* ont été gracieusement fournit par le Dr Goormachtig (Université de Ghent, Belgique) ; les graines des simples mutant Col-O *cyp707a2.1*, Col-O *cyp707a3.1* et les graines du double mutant Col-O *cyp707a1.2-a2.1* ont été gracieusement fournit par le Dr Nambara (Université de Nagoya, Japon) et multipliées au laboratoire en 2013. Les plantes ont été cultivées dans des cabines de culture à 21°C, avec une photopériode de 18/6 h (jour/nuit), sous lumière fluorescente (100.10^{-6} E), sur du sol stérilisé. Les graines ont ensuite été stockées à -80°C deux semaines après la récolte afin de préserver la dormance primaire, ou à température ambiante durant 2 mois pour effectuer la post maturation.

Avant utilisation, les graines sont désinfectées en surface selon le protocole de Lechat et collaborateurs (2012), avec quelques modifications mineures : 5min dans de l'hypochlorite de sodium (12%), puis soigneusement rincées trois fois pendant 1min, puis trois fois 5min avec de

Tableau 2.1 Amorces RT-PCR utilisées dans cette étude.

Gene	Nom de l'amorce	Sequence de l'amorce 5'->3'	Taille de l'amplicon (pb)	Application
PrEF1-a	QPrEF1-UP	TTG CCG TGA AGG ATC TGA AAC	63	Contrôle RT-PCR
	QPrEF1-DOWN	CCT TGG CAG GGT CGT CTT TA	…	
OcEF1-a	QOcEF1-UP	CCT GGT ATG CTC GTC ACT TTT G	69	Contrôle RT-PCR
	QOcEF1-DOWN	CAT GGT GCA TCT CCA CAG ATT	…	
OmEF1-a	QOmEF1-UP	TGA GGT TAA GTC TGT GGA GAT GCA	83	Contrôle RT-PCR
	QOmEF1-DOWN	CAA CAT TCT TAA CAT TGA AGC CAA CAT	…	
ShEF1-a	QShEF1-UP	CGT GGT TAT GTG GCC TCC AA	85	Contrôle RT-PCR
	QShEF1-DOWN	CCA GGG TGG TTC ATG ATG ATC	…	
TvACTIN-1	QTvACT-1-UP	ACC CGA TCC TTC TCA CTG A	130	Contrôle RT-PCR
	QTvACT-1-DOWN	CAT GAC AAT ACC AGT CGT ACG	…	
At18s	QAt18s-UP	TCC TAG TAA GCG CGA GTC ATC	100	Contrôle RT-PCR
	QAt18s-R	CGA ACA CTT CAC CGG ATC AT	…	
PrCYP707A1	QPrCYP707A1-UP	GCT CGT TCT ACG CGC ATT C	60	Cible RT-PCR
	QPrCYP707A1-DOWN	GGC TTC GAT GTC TGA GAT GAT G	…	
OcCYP707A1	QOcCYP707A1-UP	CTC GTT CTG CGC GCA TT	64	Cible RT-PCR
	QOcCYP707A1-DOWN	CGA TGT CCG TAA CGG TGT TTT	…	
OmCYP707A1	QOmCYP707A1-UP	CTC GTT CTG CGC GCA TT	64	Cible RT-PCR
	QOmCYP707A1-DOWN	CGA TGT CCG TAA CGG TGC TTT	…	
ShCYP707A1	QShCYP707A1-UP	GTA ACG AGT TGG CGA AAA TGC	80	Cible RT-PCR
	QShCYP707A1-DOWN	ACC CGA GCA AAT CGT TAT AGC T	…	
TvCYP707A1	QTvCYP707A1-UP	CCC TTG TCC CCG ATA TCG AT	65	
	QTvCYP707A1-DOWN	TGA TTA ATT TGC CTT CCC ATG A	…	Cible RT-PCR
TvCYP707A2	QTvCYP707A2-UP	TTA CTT CTA TTC TCT TCA TTG TTC TGT TCA	109	Cible RT-PCR
	QTvCYP707A2-DOWN	TCC TAT GTA AGG CCA ACC CAT T	…	
TvCYP707A3	QTvCYP707A3-UP	TGA ATC CAT TGC ACA AAC TTG	145	Cible RT-PCR
	QTvCYP707A3-DOWN	TTT CCC TAA CAT CCT TTC TTT GCT	…	
AtCYP707A1	QAtCYP707A1-UP	TTG GAA AGA GGAGACTAG AG	121	Cible RT-PCR
	QAtCYP707A1-DOWN	CAC TTG GTG TTT TGT CCT TG	…	
AtCYP707A2	QAtCYP707A2-UP	AAA TGG AGT GCA CTC ATG TC	110	Cible RT-PCR
	QAtCYP707A2-DOWN	CCT TCT TCA TCT CCA ATC AC	…	
AtCYP707A3	QAtCYP707A3-UP	ATT CTT GTC CAG GCA ATG AG	144	Cible RT-PCR
	QAtCYP707A3-DOWN	ATA GGC AAT CCA TTC TGA GG	…	
AtCYP707A4	QAtCYP707A4-UP	GAA AGG AAT ACA GTA CAG TC	125	Cible RT-PCR
	QAtCYP707A4-DOWN	GGA TTA GAT TTG GCT AAC TAC	…	

l'eau distillée stérile. Les graines sont ensuite suspendues dans du tampon phosphate Na/K à 1.10^{-3} M (pH 7,5, ajusté avec du KOH) et du PPM 0,1% (Plant preservative mixture, Kalys, Bernin, France), avec un ratio masse de graines sur volume de 10 mg/ mL pour les *Orobanches*, *Phelipanche*, et *S. hermonthica*, et 20 mg/ mL pour *T. versicolor* et *A. thaliana*.

2.2 Tests de germination et molécules utilisées

Les graines désinfectées sont conditionnées en plaques 96 puits (Cell Culture Multiwell Plate Cellstar, Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany), selon le protocole de Pouvreau et collaborateurs (2013) (Annexe 1). Les graines sont distribuées à raison d'environ 100 graines par puits pour les *Orobanche*, *P. ramosa* et *S. hermonthica*, et à raison de 10 graines par puits pour *T. versicolor* et *A. thaliana*. Les graines d'*Orobanche* et de *P. ramosa* sont conditionnées dans le noir à 21°C durant 7J (Joel et *al.*, 1995a ; Gibot-Leclerc et *al.*, 2004). Celles de *S. hermonthica* sont conditionnées 7J à 30°C à l'obscurité (Joel et *al.*, 1995a). Pour avoir une germination optimale, les graines de *T. versicolor* sont stratifiées 7J à 4°C à l'obscurité (Honaas et *al.*, 2013). Les graines d'*A. thaliana* ont été utilisées sans stratification afin de conserver la dormance primaire.

Après le conditionnement ou la stratification, les graines sont traitées avec les stimulants de germination à différentes concentrations dans 0.1% d'acétone finale : Le buténolide KAR1 (3-méthyl-2H-furo [2,3-c] pyranne-2-one) aimablement fourni par le Dr Flematti (Université d'Australie de l'Ouest), le GR24, le dehydrocostus lactone (DCL - Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), ou le 2-Phenylethyl Isothiocyanate (2-PEITC - Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), dans un volume final de 100µL par puits. Les expériences contrôles sont réalisées avec de l'acétone 0.1% finale. Par la suite, les plaques sont incubées, à l'obscurité durant 4 J, à 30°C pour *S. hermonthica*, à 21°C pour *O. cumana*, *O. minor* et *P. ramosa*, 8J à 21°C pour *A. thaliana*, et avec une photopériode de 18/6 durant 16J à 16°C pour *T. versicolor*.
L'Abz-E2B, un inhibiteur des ABA 8'-hydroxylases (Okazaki et *al.*, 2011), ou l'acide abscissique (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) sont solubilisé dans de l'acétone pur et utilisés pour les essais d'inhibition de la germination sur une gamme de concentration de 10^{-3} à10^{-9} M. Ces molécules sont ajoutées conjointement aux stimulants de germination (10^{-6} M) dans chaque puits. Les volumes finaux sont ajustés à 100µL avec de l'eau distillée pour une concentration finale en acétone de 0,1%.

Les graines, colorées par le methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (MTT) (Pouvreau et al., 2013), sont considérées comme germées lorsque la radicule a protruée hors des téguments. Chaque essai a été répété au moins trois fois.

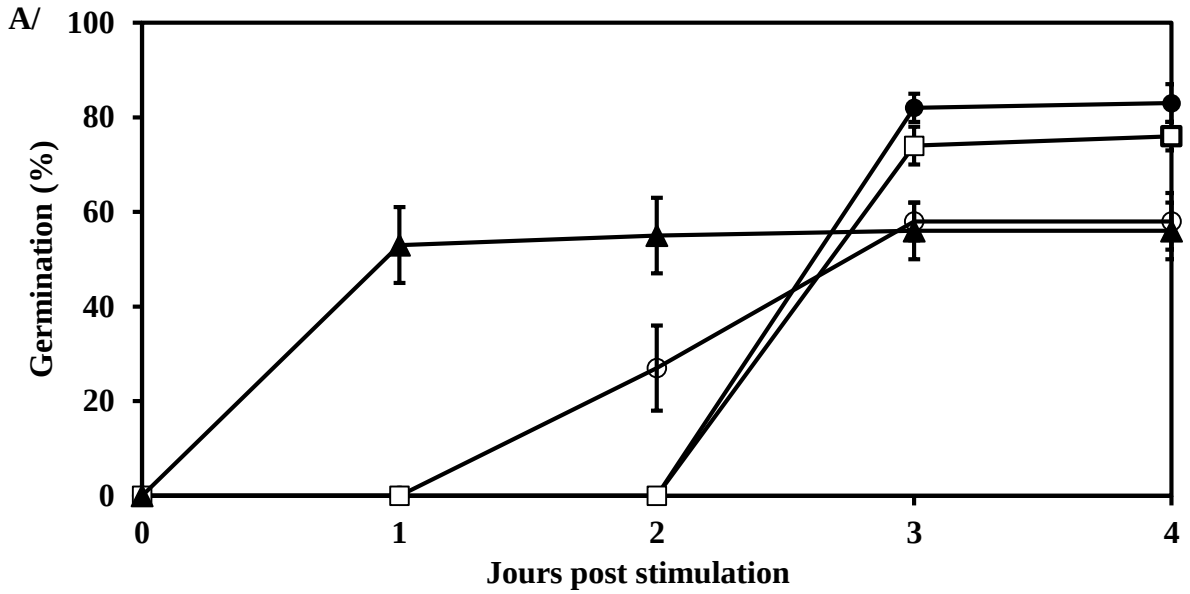


Fig. 2.1 Cinétique de germination des plantes parasites obligatoires en réponse au GR24.

Activité stimulante du GR24 (1.10^{-6} M) sur la germination de graines conditionnées 7J de *P. ramosa* (cercle noir), *O. cumana* (cercle blan), *O. minor* (carré blanc) et *S. hermonthica* (triangle noir). Témoin négatif acétone 0,1%, aucune germination Les valeurs sont des moyennes ± ES, n=6.

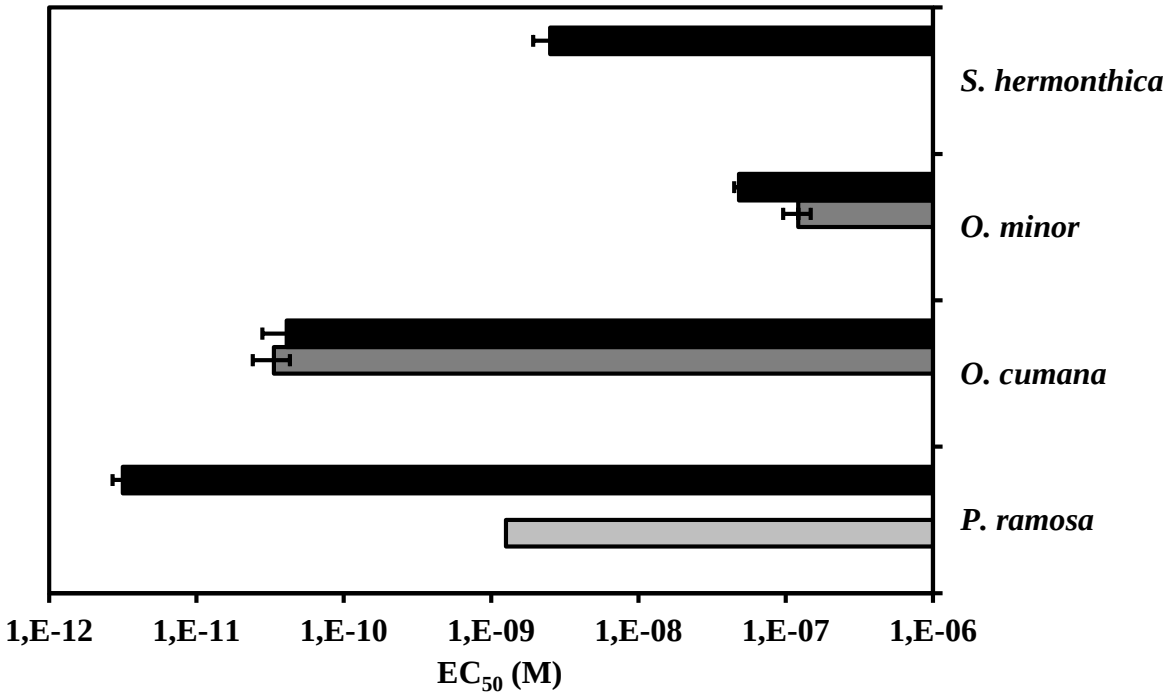


Fig. 2.2 Relations structure-activité des stimulants de germination sur la germination des graines de plantes parasites obligatoires.

Stimulation concentration-dépendante du GR24 (barre noire), du DCL (barre gris claire), et du 2-PEITC (barre gris foncée) sur des graines conditionnées 7J. La germination a été mesurée 4J après stimulation. Témoin négatif acétone 0.1%, aucune germination. Les valeurs sont des moyennes ± ES, n=6. EC_{50} = Concentration efficace médiane.

Pour les tests de viabilité des graines après l'addition d'Abz-E2B ou d'ABA, les graines traitées sont rincées trois fois avec 100µL de tampon phosphate (1 mM, pH 7,5 ; PPM 0,1%). Les graines sont ensuite stimulées de nouveau avec du GR24 1.10^{-9} M, 0,1% d'acétone. Les plaques sont ensuite incubées aux temps et températures mentionnées précédemment avant la détermination du taux de germination.

Les IC_{50} et EC_{50} ± erreur standard (ES), ont été déterminées à partir des courbes doses-réponses [g = f(c), où le pourcentage de germination (g) résulte d'une fonction (f) de la concentration du composé testé (c)] modélisées par une courbe logistique à quatre paramètres sur au moins trois gammes de dilutions indépendantes. Les données ont été calculées à l'aide du logiciel SigmaPlot® V.10.0 (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA). Une analyse de variance a été effectuée sur les résultats obtenus en utilisant SigmaPlot version 10.0 ($P<0,05$, test de Student-Newman-Keuls, SNK).

2.3 Préparation des échantillons

Pour les analyses moléculaires, 5ml de graines stérilisées (200mg) ont été conditionnées ou stratifiées et traitées en flasque de culture cellulaire (Becton Dickinson, New Jersey., USA) dans du tampon phosphate (1 mM, pH 7,5 ; PPM 0,1%). Après conditionnement ou stratification, les graines ont été traitées avec les mêmes SG cités précédemment pour les tests de germination. Des expériences contrôles ont été réalisées avec des graines traitées à l'acétone 0,1%. Pour déterminer l'expression des gènes *CYP707A*, les graines ont été stimulées avec les différents SG durant 2 h pour *S. hermonthica* et 6 h pour les autres espèces, avant d'être récoltées. Après traitement les graines ont été récoltées par filtration sur un tamis nylon de 100µm, séchées sur du papier absorbant, pesées, congelées dans de l'azote liquide, et stocker à -80°C, avant les extractions d'ARNs. Un aliquote est conservé pour évaluer le taux de germination après stimulation.

2.4 Extractions d'ARNs, clonages des ADNc et obtention des séquences CYP707A

Les ARNs totaux ont été isolés à partir de 200mg de graines traitées au GR24, durant 2 h pour *S. hermonthica* et 6 h pour les autres espèces, en utilisant le kit Nucleospin RNA Plant Kit (Macherey Nagel, Hoerdt, France), ou en accord avec le protocole de Onate-sanchez et collaborateurs (2008) pour *A. thaliana*. Les ARNs extrait ont ensuite été traités avec 6,8 Kunitz units de Free-RNase DNaseI (Qiagen, Courtaboeuf, France) et nettoyés avec le kit RNA clean up XS (Macherey Nagel, Hoerdt, France). L'intégrité des ARNs totaux a ensuite été vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose 2% (m/v) et les ARNs quantifiés par spectophotométrie (A260/280; NanoDrop Spectrophotometer ND-1000, Labtech International Ltd, Rigmer, UK).

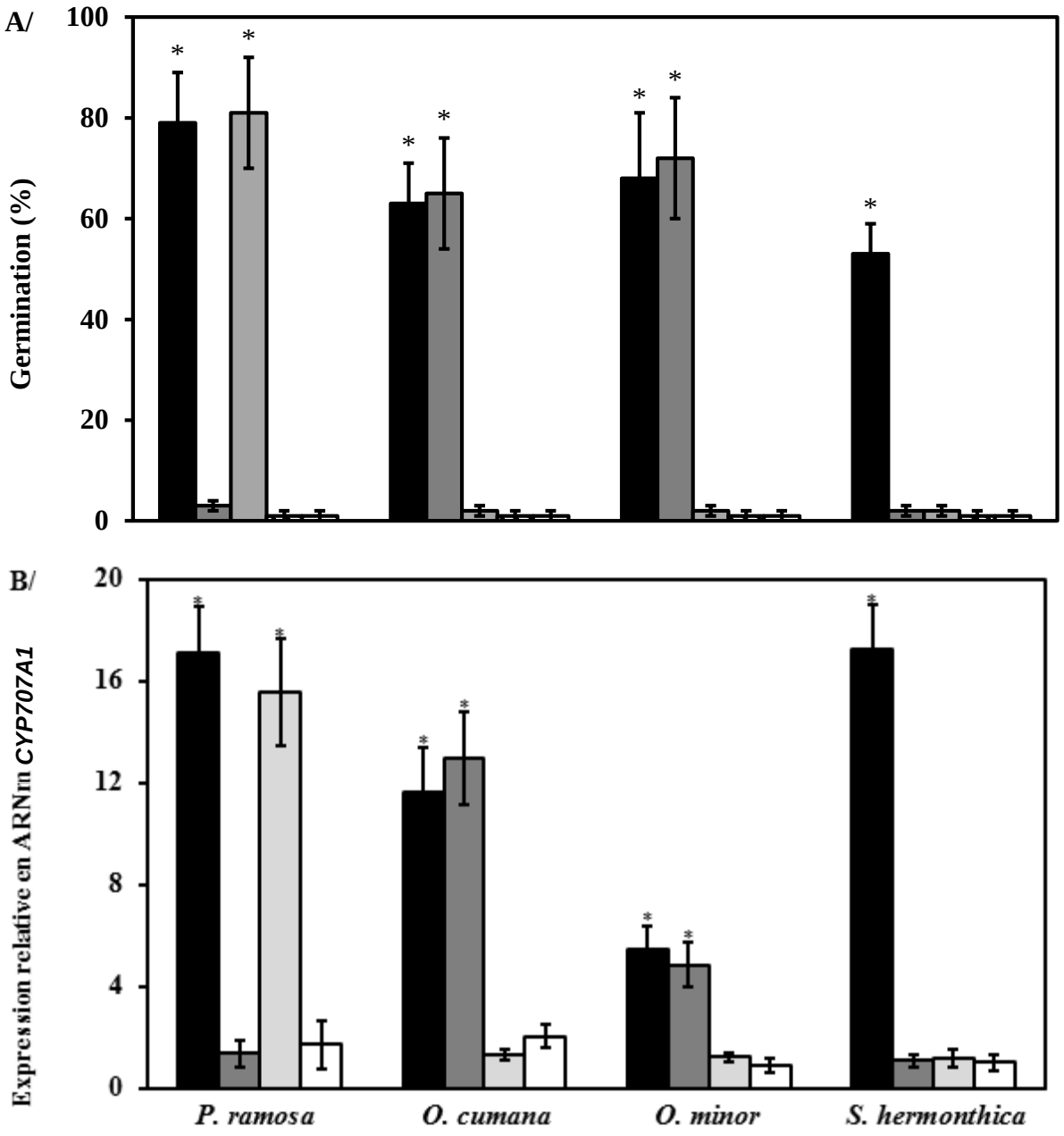


Fig. 2.3 Les molécules qui induisent la germination des plantes parasites obligatoires entrainent une surexpression du gène *CYP707A1*.

Activité stimulante à 1.10^{-6} M du GR24 (barre noire), du DCL (barre grise foncée), du 2-PEITC (barre grise claire), et de KAR1 (barre hachurée) sur des graines conditionnées 7J. **A/** Pourcentage de germination 4J après stimulation. Les valeurs sont des moyennes ± ES, n=6. **B/** Expression des gènes *CYP707A1* après 2 h de traitement pour *S. hermonthica* et 6 h pour les autres espèces. Témoin négatif acétone 0.1% (barre blanche). Les valeurs sont des moyennes ± ES, n=3. Une étoile (*) montre une évolution significative du taux de transcrit en comparaison avec des graines non stimulées, (SNK P<0,05) normalisé par l'expression du gène EF1-α.

Les ADNc ont été synthétisés à partir de 0,5.10^{-6} g d'ARN totaux en utilisant le kit SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) avec des amorces oligodT 18Bio en accord avec le protocole du fabriquant. Des amorces spécifiques correspondant à des régions hautement conservées des séquences *CYP707A* entre *P. aegyptiaca*, *S. hermonthica* et *T. versicolor* disponible dans la banque de séquence du PPGP (http://ppgp.huck.psu.edu/), *P. ramosa CYP707A1* (1770 pb) et *CYP707A2* (1645 pb) (numéro d'accession JQ838174 et JQ838175, respectivement) et *A. thaliana CYP707A1* (1995pb) *CYP707A2* (1975pb), *CYP707A3* (1809pb) et *CYP707A4* (1685pb) (numéro d'accession AT4G19230, AT2G29090; AT5G45340; et AT3G19270, respectivement), ont été conçus. Pour amplifier les différents transcrits *CYP707A* chez toutes ces espèces, nous avons utilisé une ADN polymérase de haute-fidélité longue distance Q5 (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) avec des cycles d'amplification de : dénaturation à 98°C durant 30 s, et une amplification composée de 35 cycles de 10 s à 98°C, 30 s à 60°C, et une élongation de 60 s à 72°C. Une étape d'amplification finale de 2 min à 72°C est également réalisée. Les fragments amplifiés ont ensuite été purifiés et clonés dans le vecteur pGEM-T easy (Promega, Madison, WI, USA). Les plasmides recombinants ont ensuite été séquencés par Eurofins MGW Operon (Ebersberg, Germany). Sur la base de ces séquences *CYP707A* partielles, de nouvelles amorces ont été générées pour effectuer une amplification rapide des extrémités (RACE) à l'aide du kit GeneRacer (Invitrogen, Carlsbad, CA, U.S.A). Les produits obtenus par RACE PCR ont ensuite été clonés et séquencés par Eurofins MGW Operon.

Deux séquences ADNc pleines longueurs ont été obtenus pour *S. hermonthica* (*ShCYP707A1* 1460 pb et *ShCYP707A2* 1679 pb), trois pour *T. versicolor* (*TvCYP707A1* 1401 pb, *TvCYP707A2* 1338 pb, et *TvCYP707A3* 1407 pb), une pour *O. cumana* (*OcCYP707A1* 1897 pb) et une pour *O. minor* (*OmCYP707A1* 1867 pb). En dépit de plusieurs tentatives, l'amplification de séquences correspondant à *OcCYP707A2* et *OmCYP707A2* a été infructueuse. Toutes les séquences obtenues sont présentées en annexe 2.

2.5 Analyses en Real-Time PCR (RT PCR)

Pour chaque séquence *CYP707A*, un couple d'amorce spécifique a été conçu avec le logiciel Primer Express 3.0 (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) (Table 2.1). Pour éviter une homologie de séquence significative avec d'autres séquences nucléotidiques connues, les amorces ont été soumises à une analyse Blast.

Les ADNc ont été synthétisés à partir de 0,5.10^{-6} g d'ARN total en utilisant le kit SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) avec des amorces

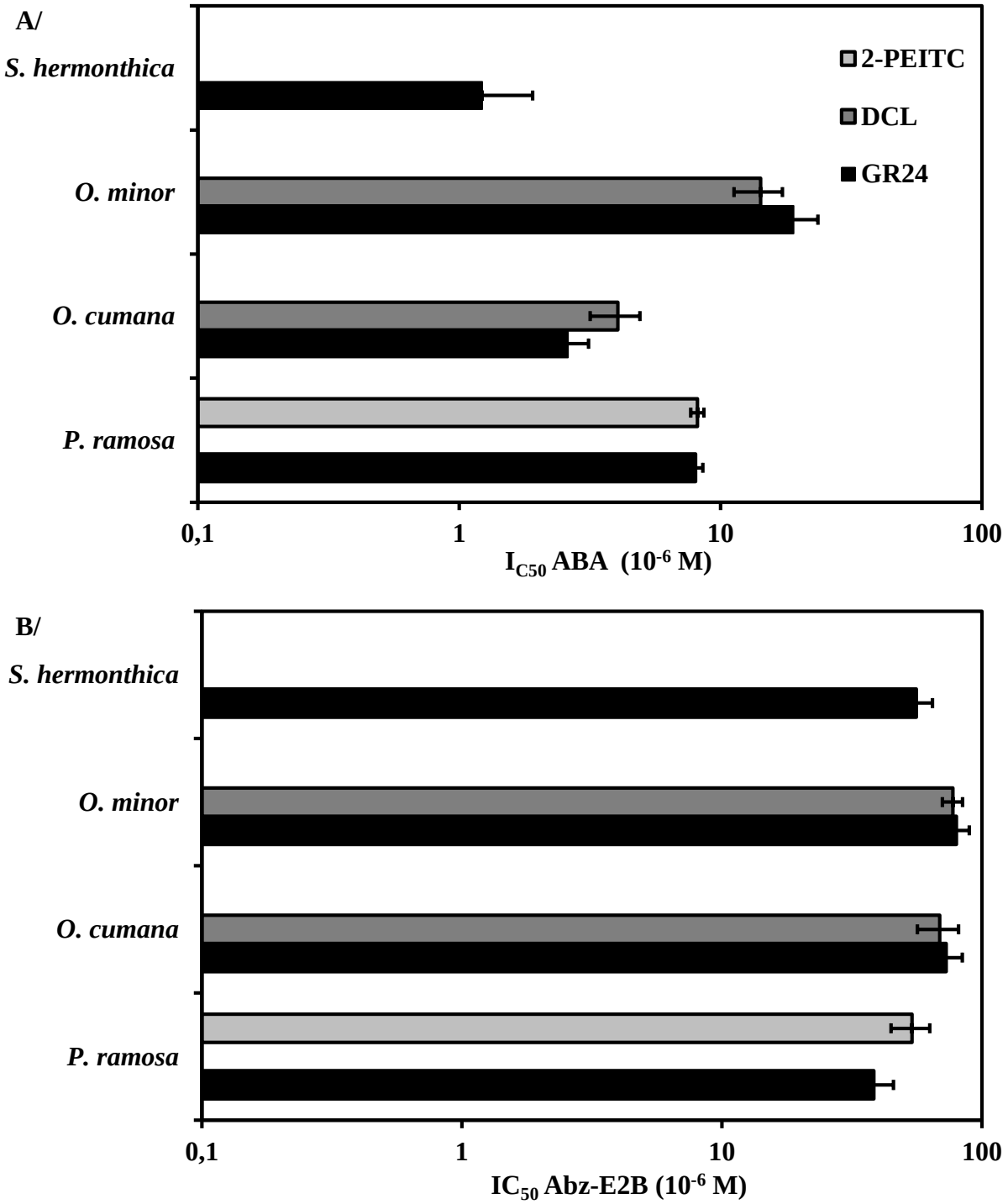


Fig. 2.4 La *CYP707A1* est la clé permettant de lever le verrou ABA inhibant la germination.

Inhibition concentration-dépendante de **A/** l'ABA et **B/** de l'Abz-E2B, sur la germination des graines des plantes parasites obligatoires conditionnées 7J et stimulées par du GR24 (barre noire), du DCL (barre grise foncée), et du 2-PEITC (barre grise claire) à 1.10^{-6} M. Les valeurs sont des moyennes ± ES, n=6. IC_{50} = Concentration inhibitrice médiane.

oligodT 18Bio et des hexamères aléatoires, suivant les instructions du fabricant. Les expériences de RT-PCR ont été réalisées en utilisant la technologie SYBER Green et effectuées sur un système Applied Biosystems 7300 real-time PCR system (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA), suivant le protocole de Lechat et collaborateurs (2012). Chaque réaction contenait 5.10^{-9} g d'échantillon d'ADNc équivalent ARN à 1.10^{-3} g/L (sauf pour l'amplification des transcrits18S d'*A. thaliana*, utilisé à 5.10^{-12} g, suivant les recommandations de Tyler et collaborateurs (2004), 300.10^{-9} M d'amorce gène spécifique et 6,25µL de Platinium SYBR Green qPCR SuperMix with ROX (Invitrogen, Carlsbad, CA, U.S.A.) dans un volume final de 25µL. Les cycles PCR ont été effectués en utilisant les conditions suivantes : 90°C pendant 10 min, et 40 cycles de 95°C durant 15 s et 60°C durant 1 min. La spécificité de l'amplification PCR a été vérifiée en utilisant un protocole de dissociation thermique (de 60 à 95°C) après le cycle final de PCR. Les changements d'expression des ARNs ont été estimés à l'aide des cycles seuils. Les résultats ont été normalisés : Pour les *Orobanche* et *S. hermonthica* par l'expression du gène constitutif codant le facteur d'élongation EF1-α ; pour *T. versicolor* par l'expression du gène constitutif codant l'actine-1 ; pour *A. thaliana* par l'expression du gène constitutif codant la sous-unité ribosomique 18S. Toutes les expressions des gènes standards présentent une faible variation de cycle seuil (<0,5 CT) pour toutes les conditions et les contrôles expérimentales au sein de la même espèce (Péron et *al.*, 2012). Une expérience témoin sans ADNc a été incluse pour chaque mix PCR. Les expériences ont été réalisées au minimum en triplicata biologique et technique. Une analyse de variance a été effectuée sur les résultats des analyses de RT-PCR en utilisant SigmaPlot version 10.0 ($P<0,05$, test SNK).

3-Résultats

3.1 La germination des plantes parasites obligatoires est sous le contrôle de l'induction stimulant dépendante d'un gène CYP707A1*, assurant la dégradation de l'acide abscissique.*

La germination des plantes parasites obligatoires est sous la dépendance de la perception d'un stimulant de germination. Ces composés sont pour la plus part associés aux SL. Afin de calibrer les tests de germination, les cinétiques de germination en réponse au GR24, un analogue de synthèse des SL ont été obtenues pour les différentes plantes parasites obligatoires dans nos conditions expérimentales (Fig. 2.1). En réponse au GR24, les graines de *S. hermonthica* germent en moins de 24h avec un maximum de germination de 55 ± 17%. Les autres plantes parasites obligatoires atteignent leurs pourcentages maximaux de germination plus tardivement, après 3J (79 ± 1,7%, 75 ± 1,4%, et 57 ± 3,4% pour *P. ramosa*, *O. minor* et *O. Cumana*¸

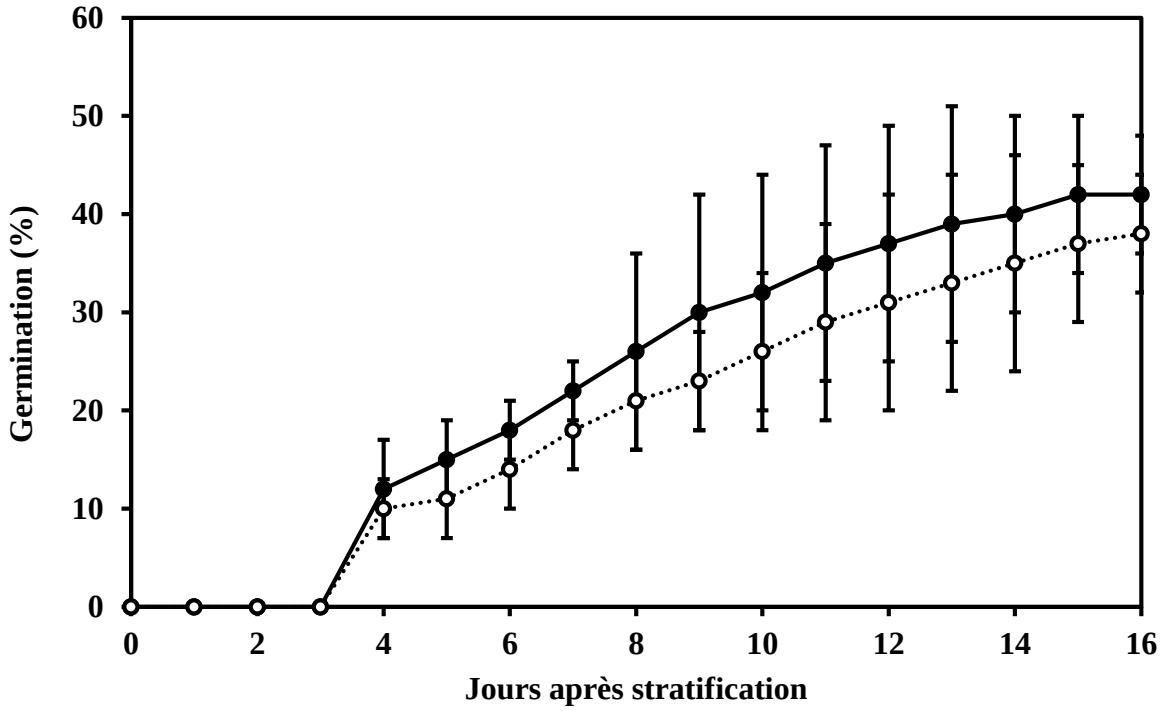


Fig. 2.5 Cinétique de germination de la plante parasite facultative *T. versicolor* en réponse au GR24.

Pourcentage de la germination de graines préalablement stratifiées de *T. versicolor* en présence de GR24 (1.10^{-6} M, ligne pleine, rond noir). Témoin négatif acétone 0,1%. (ligne en pointillé ; rond blanc). Les valeurs sont des moyennes ± ES, n=6.

respectivement). Les germinations induites par le GR24 sont synchrones et observées sur 24 h pour *S. hermonthica*, *O. minor*, *O. cumana* et 48 h pour *P. ramosa*. Une durée d'incubation de 4J post stimulation est suffisante et a donc été donc choisie pour comparer l'activité des autres molécules sur la germination de ces espèces.

Les activités du GR24, du DCL, du 2-PEITC et de KAR1 à des concentrations de 10^{-6} à 10^{-13} M, ont alors été étudiées sur la germination des 4 espèces de plantes parasites obligatoires et les EC_{50} déterminés pour les composés actifs (Fig. 2.2). Pour une même espèce, les taux de germination maximaux obtenus pour les composés stimulants ne diffèrent pas d'un composé à l'autre ($P<0.05$). Par exemple pour *P. ramosa* le GR24 et le 2 PEITC induisent au maximum 79 ± 1,7% et 82 ± 3 % de germination, respectivement (t-test, $P<0.05$). Les EC50 sont donc alors utilisés pour comparer la sensibilité aux stimulants. Le GR24 induit la germination des 4 espèces étudiées mais leur sensibilité est variable, allant du picomolaire au nanomolaire. L'espèce la plus sensible est *P. ramosa* ($EC_{50,}$ 3,1 ± 0,5 .10^{-12} M) suivie de *O. cumana* ($EC_{50,}$ 4,1 ± 1,3. 10^{-11} M), et *S. hermonthica* ($EC_{50,}$ 2,5 ± 0,6. 10^{-9} M), *O. minor* est la moins sensible ($EC_{50,}$ 4,8 ± 0,36. 10^{-8} M). Contrairement au GR24, le DCL n'induit la germination que de *O. cumana* et *O. minor* avec des EC_{50} respectifs de 3,3±0,9. 10^{-11} M et 1 ± 0,3. 10^{-7} M. De même, le 2-PEITC n'induit la germination que de *P. ramosa* (EC_{50} de 1,2 ± 0,2. 10^{-9} M). La karrikine, KAR1, n'a stimulée la germination d'aucune des espèces considérées dans nos conditions expérimentales et sur la plage de concentration utilisée (Fig. 2.2). Le GR24 est le composé le plus actif pour *P. ramosa* et *O. minor* comparé au 2PEITC et DCL respectivement (1000 fois et 10 fois) contrairement à *O. cumana* chez qui l'activité est similaire à celle du DCL. Les plantes parasites obligatoires présentent donc un panel de sensibilité différente aux composés aussi bien au sein d'une espèce qu'entre les espèces. La notion de stimulant de germination pour un composé est donc dépendante de l'espèce étudiée et de sa concentration. Par exemple, le DCL n'est un stimulant de germination que pour *O. cumana* et *O. minor* pour des concentrations supérieures à 10^{-10} M et 10^{-7} M respectivement.

Afin d'étudier l'induction des gènes *CYP707A1* en réponse aux stimulants de germination chez les plantes parasites obligatoires, l'expression de ces gènes et les pourcentages de germination ont été étudiés pour des graines conditionnées traitées avec les différents composés à une concentration de 1.10^{-6} M (Fig. 2.3). Pour chaque molécule capable de stimuler la germination, une surexpression d'un gène *CYP707A1* a été observée. Ainsi, le GR24, stimulant pour l'ensemble des espèces, induit une accumulation significative en ARNm *CYP707A1* (17,1 ± 1,8 ; 11,6 ± 1,8 ; 5,4 ± 0,9 ; et 17,1 ± 1,8 chez *P. ramosa*, *O. cumana*,

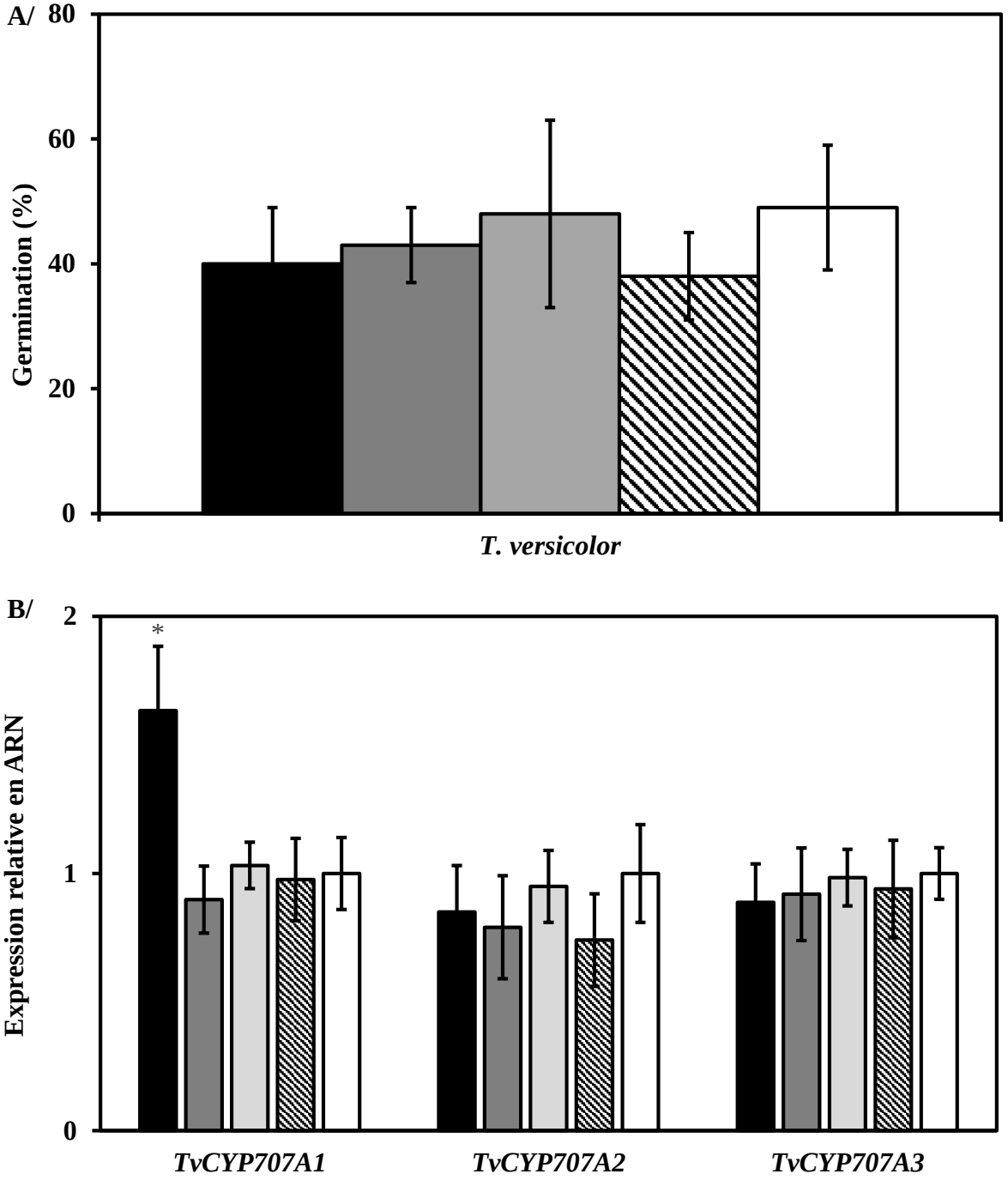


Fig. 2.6 Le GR24 induit la surexpression spécifique du gène *TvCYP707A1* de *T. versicolor*.

Le GR24 (barre noire), le DCL (barre grise foncée), le 2-PEITC (barre grise claire), et le KAR1 (barre hachurée) sont appliqués à 1.10^{-6} M sur des graines préalablement stratifiées de *T. versicolor*. **A/** Pourcentage de germination 16J après traitement. Les valeurs sont des moyennes ± ES, n=6. **B/** Expression des gènes *CYP707A* après 6 h de traitement. Témoin négatif acétone 0.1% (barre blanche). Les valeurs sont des moyennes ± ES, n=3. Une étoile (*) montre une évolution significative du taux de transcrit en comparaison avec des graines non stimulées, (SNK P<0,05) normalisé par l'expression du gène Actin-1.

O. minor et *S. hermonthica*, respectivement) et un pourcentage de germination maximum. Au contraire, KAR1, molécule non stimulante dans notre étude, ne provoque, elle, ni germination ni accumulation d'ARNm *CYP707A1*. Le DCL n'induit quant à lui, la surexpression du gène *CYP707A1* que pour *O. cumana* et *O. minor* (de 13 ± 1,8 et 4,8 ± 0,9 respectivement), seules espèces qui germent en réponse au DCL. Dans le cas du 2-PEITC, seule *P. ramosa* présente une surexpression du gène *PrCYP707A1* (15,5 ± 2) et germe. Au sein de chaque espèce, la surexpression du gène *CYP707A1* et les pourcentages de germination ne sont pas différents pour les différents stimulants à 10^{-6}M (ANOVA, $P<0.05$). De plus, un seul et même gène *CYP707A1* est induit pour différents stimulants au sein d'une espèce. Par exemple chez *P. ramosa* seule *PrCYP707A1* est recrutée par le 2PEITC et le GR24 et non *PrCYP707A2* (données non présentées). Les molécules induisant une germination effective induisent donc l'accumulation des ARNm *CYP707A1* au sein des espèces de plantes parasites obligatoires.

Les gènes *CYP707A* codent des ABA 8'-hydroxylases, enzymes de dégradation de l'acide abscissique. L'implication de l'ABA et de cette enzyme dans la germination des plantes parasites obligatoires en réponse aux stimulants de germination ont alors été étudiées. Les activités inhibitrices de germination de l'ABA (Fig. 2.4A) et de l'Abz-E2B (Fig. 2.4B), un inhibiteur spécifique des CYP707A, ont été déterminées pour les 4 espèces en réponse aux stimulants de germination (10^{-6} M). La germination est inhibée de manière concentration dépendante par l'ABA (10^{-9} à 10^{-3} M). L'ABA à 100.10^{-6} M inhibe totalement la germination induite par les stimulants chez ces 4 espèces (données non présentées). Pour le GR24, stimulant des 4 espèces, *S. hermonthica* est l'espèce la plus sensible à l'inhibition par l'ABA (IC_{50} ; 1 ± 0,7 $.10^{-6}$ M) suivie de *O. cumana* (IC_{50}; 2,6 ± 0,5 $.10^{-6}$ M), *P. ramosa* (IC_{50}; 8 ± 0,5 $.10^{-6}$ M) et de *O. minor* qui est la moins sensible (IC_{50}; 19 ± 4,5 $.10^{-6}$ M). Au sein d'une même espèce, l'inhibition par l'ABA n'est pas dépendante du stimulant (ex. *P. ramosa* IC_{50} 2-PEITC, 8,1 ± 0,5 $.10^{-6}$ M ; GR24, 8 ± 0,5 $.10^{-6}$ M, Fig. 2.4A). L'Abz-E2B inhibe également la germination en réponse aux stimulants de germination de manière concentration dépendante. Une inhibition totale de la germination de toutes ces espèces est observée par l'Abz-E2B à 250.10^{-6} M (données non présentées). Les IC_{50} de l'Abz-E2B, vis-à-vis des différents stimulants chez les 4 plantes parasites sont compris entre de 38,4 ± 7,3 et 79,8 ± 9,6 $.10^{-6}$ M, mais les différences observées ne sont pas significatives (ANOVA; $P<0.05$; Fig. 2.4.B). L'ensemble de ces données montre que la dégradation de l'ABA par une activité CYP707A est nécessaire à la germination des plantes parasites obligatoires en réponse aux stimulants.

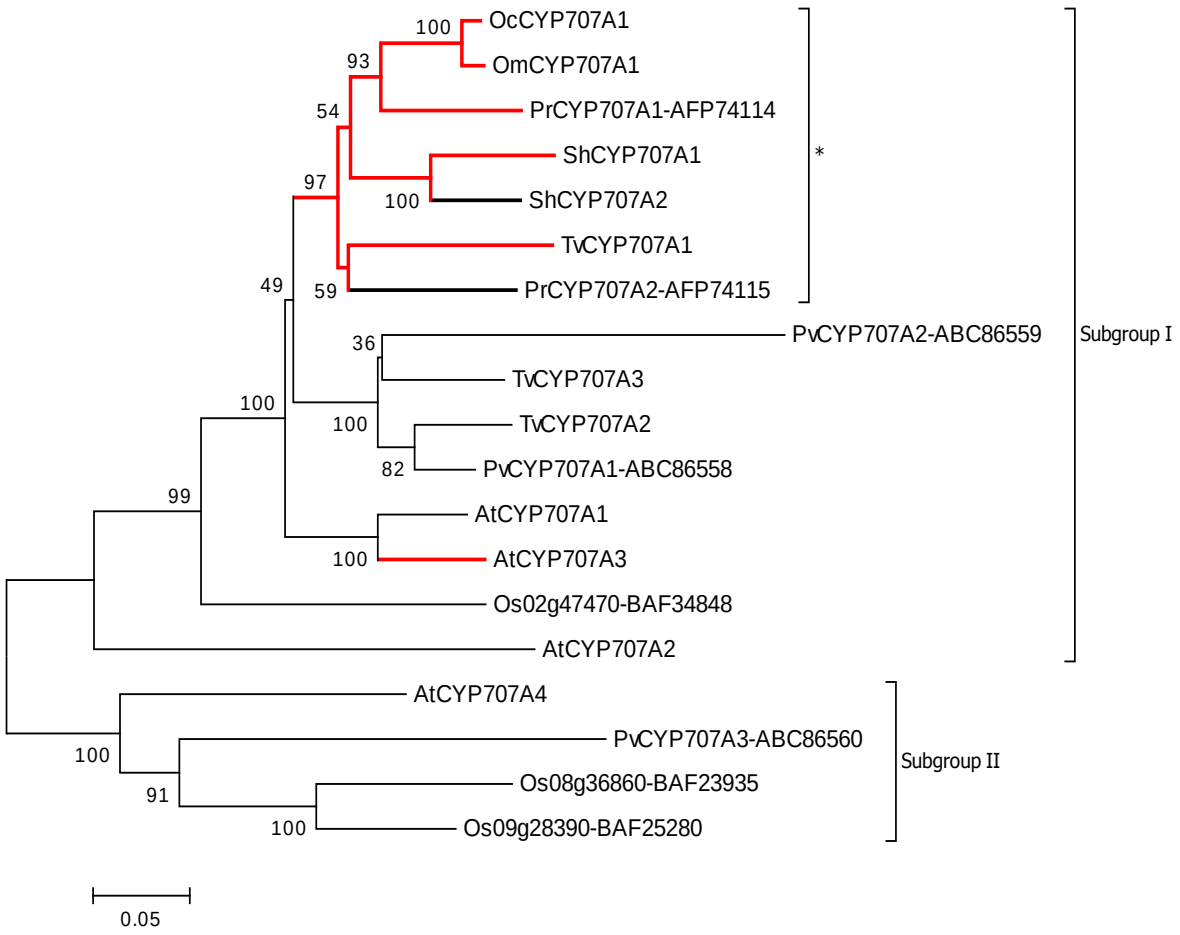


Fig. 2.7 Analyse phylogénétique des séquences protéiques CYP707A chez différentes espèces.

Les séquences putatives en acides aminées des protéines CYP707A provenant des plantes parasites obligatoires *P. ramosa*, *O. cumana*, *O. minor* et *S. hermonthica*, de la plante parasite facultative *T. versicolor*, et des plantes non parasites *Arabidopsis thaliana*, *Phaseolus vulgaris* et *Oryza sativa* ont été comparées. L'arbre a été construit en utilisant MEGA 6 (Tamura et *al.*, 2013) avec la méthode de neighbor-joining (Saitou et *al.*, 1987). La valeur bootstrap de chaque noeud est indiquée au-dessus (1000 répétitions) (Felsenstein et *al.*, 1985). Les distances évolutives ont été calculées selon la méthode de correction de Poisson (Zuckerandl et *al.*, 1965). Les branches de couleurs rouges représentent les gènes identifiés comme étant surexprimés en réponse aux stimulants de germination.

La CYP707A1 induite par les stimulants de germination constitue donc un mécanisme conservé permettant de lever le verrou commun qu'est l'ABA et permet la germination des plantes parasites obligatoires. La stimulation correspond donc à une levée de dormance imposée par la diminution de la concentration endogène en ABA et permet alors la germination des graines de plantes parasites obligatoires.

3.2 Les strigolactones sont capable d'induire la surexpression du gène TvCYP707A1 chez la plante parasite facultative T. versicolor.

Les plantes parasites facultatives, contrairement aux obligatoires, ne nécessitent pas la perception d'un stimulant de germination pour germer. Les SL et les karrikines peuvent cependant améliorer la germination de plantes non parasites (Dixon et *al.*, 2009 ; Flematti *al.*, 2010). Afin d'identifier une éventuelle voie SG-dépendante présente chez les plantes parasites non obligatoires, les cinétiques de germination de *T. versicolor* en présence ou non de GR24 ont été comparées (Fig. 2.5). Après une période de stratification de 4J, l'optimum de germination est atteint au bout de 16J (38 ± 7%) sans GR24. La présence de GR24 à 1.10^{-6} M, ajouté après stratification (4j), ne modifie significativement ni la cinétique de germination, ni le pourcentage de germination maximal à 16J (43 ± 8%, ANOVA, $P<0.05$). De même, les 3 autres composés KAR1, le DCL et le 2-PEITC (1.10^{-6} M) ne modifient pas significativement la germination par rapport au contrôle 16J après traitement (Fig. 2.6.A). Cependant, alors que les expressions des gènes *TvCYP707A2* et *TvCYP707A3* ne présentent aucune modification en réponse aux stimulants de germination par rapport au contrôle non stimulé (Fig. 2.6.B), le gène *TvCYP707A1* est surexprimé d'un facteur 1.7 ± 0.2, spécifiquement en réponse au GR24.

La germination de *T. versicolor* en présence ou non de GR24 est inhibée de manière concentration dépendante par l'ABA et l'Abz-E2B. Une concentration en ABA ou en Abz-E2B de 250.10^{-6} M engendre une inhibition totale de la germination. Avec ou sans GR24, les IC_{50} de l'ABA sur la germination de *T. versicolor* sont similaires (100,7 ± 39,1 et 119.8 ± 29,4 $.10^{-6}$ M, respectivement). De même, les IC_{50} de l'Abz-E2B sur la germination de *T. versicolor* avec ou sans GR24 ne sont pas significativement différents (128,6 ± 27,8 $.10^{-6}$ M et 118,3 ± 31,4 $.10^{-6}$ M, respectivement). La germination de *T. versicolor* est donc également sous le contrôle de la dégradation de l'ABA par les *CYP707A*.

Dans les graines de *T. versicolor*, une voie SG-dépendante est donc présente et induit la surexpression d'un gène *TvCYP707A1*. Cette voie ne répond chez ce parasite facultatif qu'à un analogue des SL, le GR24, mais dans nos conditions expérimentales elle n'impacte ni la cinétique de germination ni l'inhibition par l'ABA ou l'Abz-E2B.

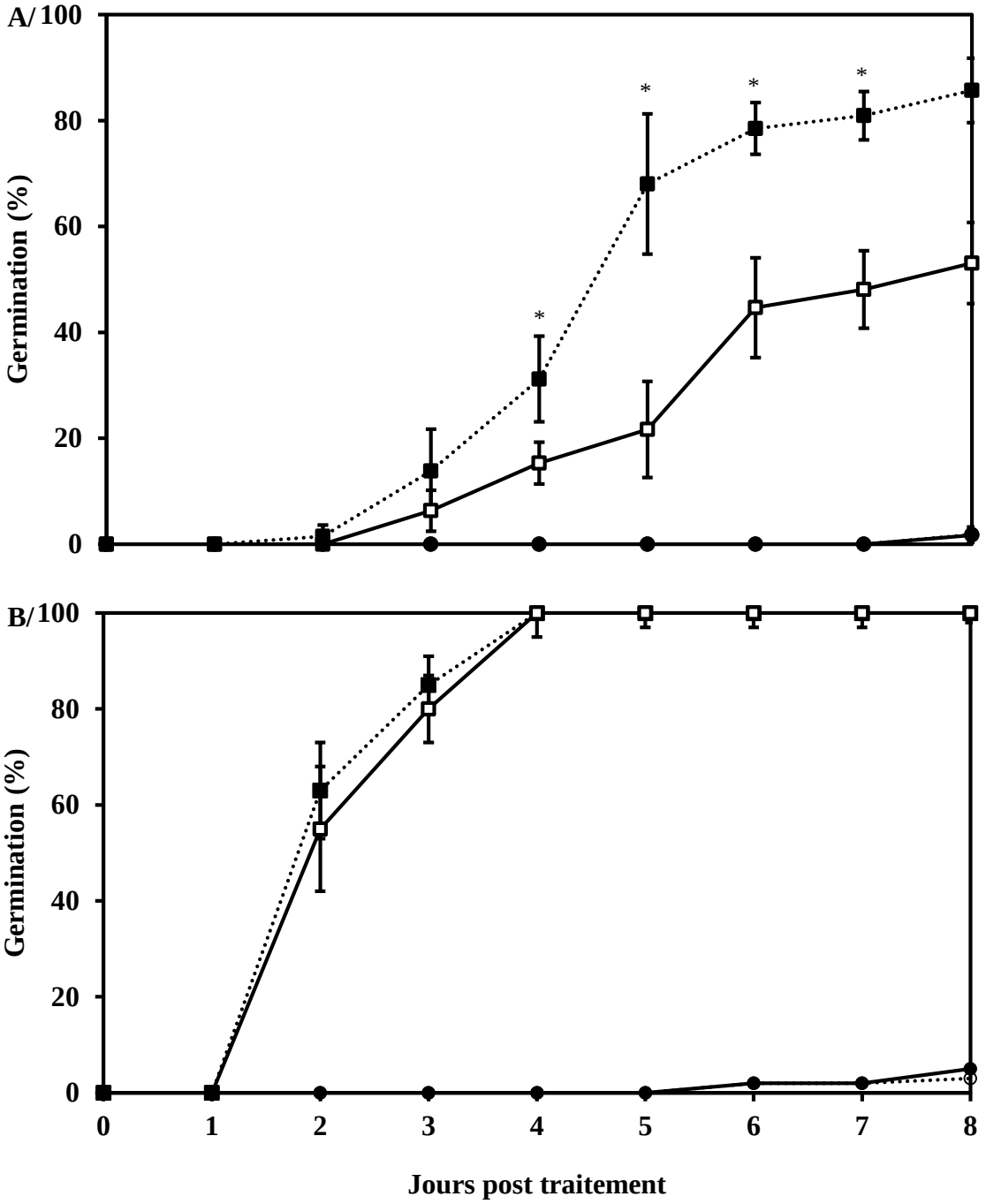


Fig. 2.8 Cinétiques de germination d'*A. thaliana* Col-O WT et du mutant *max2* en réponse au GR24, en dormance primaire et en post maturation.

Pourcentage de germination, au noir à 21°C, des graines d'*A. thaliana* Col-O WT (carré) et *max2.1* (cercle), **A/** en dormance primaire ou **B/** post-maturées**,** en réponse au GR24 2.10^{-5} M (ligne en pointillé, symbole noir). Témoin négatif acétone 0.1% (ligne pleine, symbole blanc). Les valeurs sont des moyennes ± ES, n=6. Une étoile (*) indique que les valeurs sont significativement différentes du témoin négatif (SNK test, $P < 0.05$).

3.3 Histoire évolutive des CYP707A au sein des Orobanchaceae.

Pour mieux comprendre l'histoire évolutive des gènes *CYP707A* au sein des *Orobanchacées,* une analyse phylogénétique a été réalisée en utilisant les séquences putatives en acide aminés des CYP707A obtenues chez les plantes parasites obligatoires *P. ramosa, O. cumana, O. minor* et *S. hermonthica* et la plante parasite facultative *T. versicolor*. Elle intègre les séquences des plantes non parasites *A. thaliana, O. sativa* et *P. vulgaris* présentées par Zheng et collaborateurs (2012) (Fig. 2.10). L'arbre obtenu confirme l'existence des deux sous-groupes 1 et 2, précédemment décrits par Zheng et collaborateurs (2012).

Les CYP707A des *Orobanchaceae* sont positionnées dans le sous-groupe 1. La plante parasite facultative *T. versicolor,* présente deux paralogues non inductibles par les SL (*TvCYP707A2* et *TvCYP707A3*), regroupés sur la même branche que ceux de *P. vulgaris* (*PvCYP707A2* et *PvCYP707A1*). Par contre le paralogue inductible par les SL (*TvCYP707A1*) est au sein du même clade que les CYP707A des plantes parasites obligatoires inductibles par les SL (*). L'arborescence des séquences *TvCYP707A1, ShCYP707A1, PrCYP707A1, OcCYP707A1* et *OmCYP707A1* suit l'évolution des espèces au sein des *Orobanchaceae* (Park et al. 2008 ; Westwood et al. 2010) et donc appuie le fait que les gènes correspondant soient des orthologues. Ce résultat suggère alors la conservation d'un orthologue *CYPA707A* répondant aux SL au sein des *Orobanchacées,* présent à l'état ancestral. Néanmoins deux copies ne répondent pas au SL, *ShCYP707A2* et *PrCYP707A2*, au sein de ce clade. La faible distance évolutive entre les deux CYP707A de *S. hermonthica* suggère une duplication récente de l'orthologue SG-dépendant associée avec une perte de la réponse SG-dépendante pour la copie *ShCYP707A2*. Le même phénomène est envisageable pour *PrCYPA2* mais plus précocement au cours de l'évolution des *Orobanchaceae*.

Il n'a pas été détecté de séquences orthologues à celles non inductibles par les SG, *TvCYP707A3* ou *TvCYP707A2* à partir d'ARNm extraits de graines chez les plantes parasites obligatoires. Ceci amène à l'hypothèse d'une perte de ces orthologues au sein des *Orobanchaceae* lors de la transition du parasitisme facultatif vers le parasitisme obligatoire.

3.4 Chez A. thaliana, *une voie de transduction du signal strigolactone menant à l'expression du gène* AtCYP707A3 *au cours de la germination, est présente.*

Ne disposant pas de mutants au sein des *Orobanchaceae* et les graines d'*A. thaliana* présentant dans certaines conditions une réponse au SL ou aux karrikines (Nelson et *al.,* 2009 ; Toh et *al.,* 2012. ; Stanga et *al.,* 2013), la présence d'un voie SG-dépendante induisant une CYP707A a été étudiée chez *A. thaliana*.

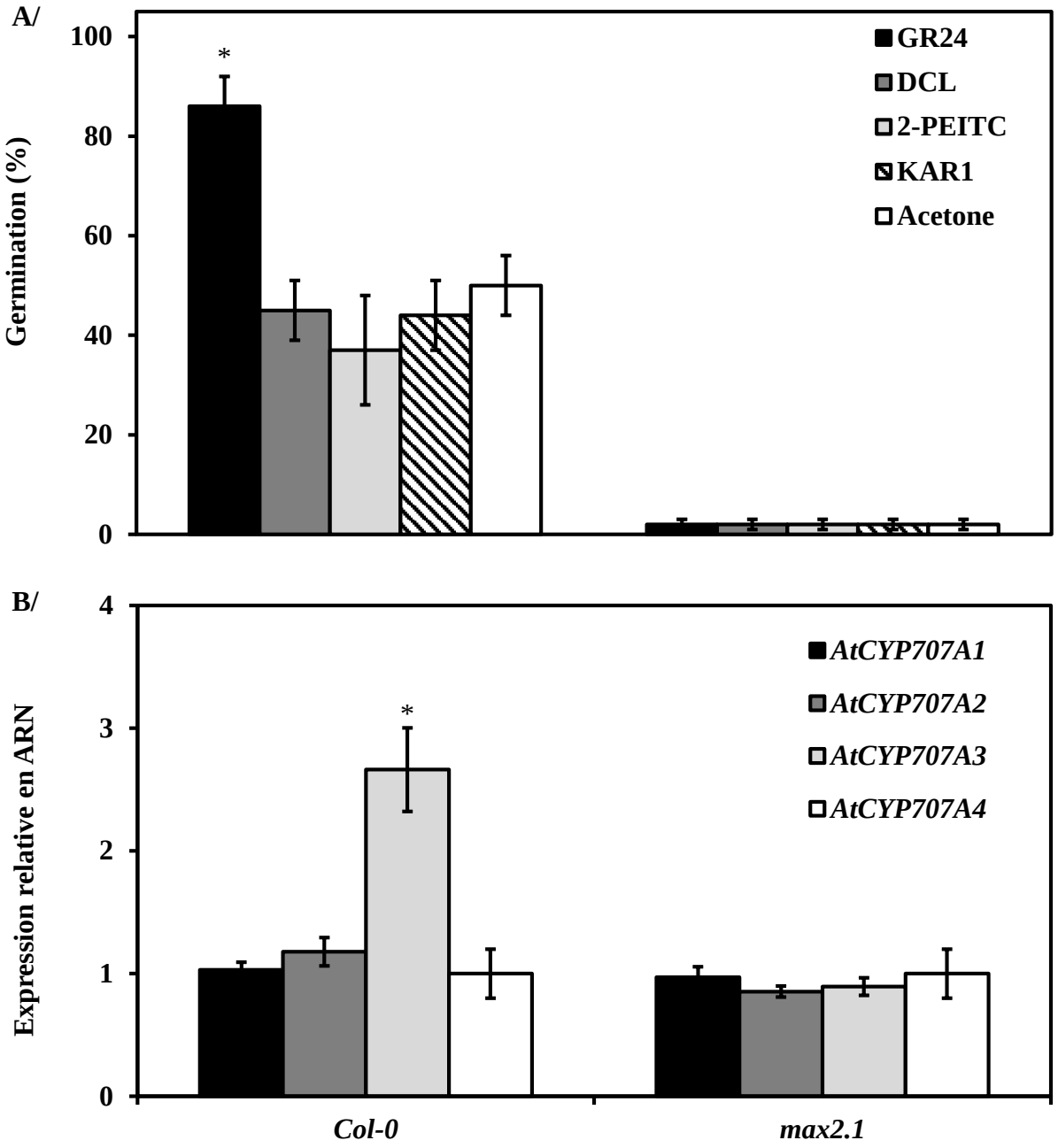


Fig. 2.9 Le GR24 stimule la germination et l'expression MAX2-dépendante du gène *AtCYP707A3* chez des graines d'*A. thaliana* en dormance primaire.

A/ Activité stimulante à 2.10^{-5} M du GR24 (barre noire), du DCL (barre grise foncée), du 2-PEITC (barre grise claire), et de KAR1 (barre hachurée) sur des graines en dormance primaire de *A. thaliana* Col-O WT et *max2*. Les taux de germination sont relevés après 8J. Les valeurs sont des moyennes ± ES, n=6. **B/** Expression des gènes CYP707A, 6 h après un traitement au GR24. Les valeurs sont des moyennes ± ES, n=3. Témoin négatif acétone 0.1% (ligne pleine). Une étoile (*) indique que les valeurs sont significativement différentes du témoin négatif (SNK test, $P < 0.05$).

Dans un premier temps, la cinétique de germination à l'obscurité d'*A. thaliana* ecotype Col-O WT en réponse au GR24 a été étudiée pour des graines à deux stades physiologiques différents : en dormance primaire ou après post maturation (Fig. 2.8). En dormance primaire (Fig. 2.8A), sans GR24, la germination optimale est obtenue au bout de 8J, elle est de 51,1 ± 9,7%. Des temps de germination plus longs ne modifient pas le pourcentage de germination maximal. Le GR24 améliore le pourcentage de germination dès 4J et le pourcentage de germination maximal augmente à 87,9 ± 5,3% (Fig. 2.8A). En revanche, une fois post maturées (Fig. 2.8B), le taux de germination maximum des graines (95 ± 5%) est atteint en seulement 4J. et ce, avec ou sans GR24. Chez Col-O WT, le GR24 peut donc activer la germination dans des conditions sub-optimales ou défavorables, c'est-à-dire à l'obscurité et pour des graines en dormance primaire. La suite des expérimentations ne sera donc réalisée que sur des graines en dormance primaire avec un temps de germination de 8J.

L'impact des 4 composés ainsi que l'expression des quatre gènes *CYP707A* d'*A. thaliana* ont alors été étudiés chez des graines de type sauvage en état de dormance primaire (Fig. 2.9). Parmi les molécules testées, seul le GR24 permet d'améliorer le taux de germination (86 ± 9%) de manière significative par rapport au témoin négatif (50 ± 6%) chez le type sauvage (Fig. 2.9A). De plus, le GR24 provoque une surexpression uniquement du gène *AtCYP707A3*, surexpression d'un facteur 2,7 ± 0,3 (Fig. 2.9B). Les gènes *AtCYPA707A2*, *AtCYP707A3* et *AtCYP707A4* ne sont eux pas surexprimés en réponse au GR24. Par contre, en réponse à l'imbibition dans les graines, les gènes *AtCYP707A1*, *AtCYP707A2* et *AtCYP707A3* sont exprimés de 4,4 ± 0,3 ; 2,3 ± 0,3, et 1,8 ± 0,2 fois, respectivement à 6 h par rapport à 1h contrairement au gène *AtCYP707A4* (1,16 ± 0.11).

Afin de vérifier que l'augmentation du taux de germination en réponse au GR24 est liée à l'expression du gène *AtCYP707A3*, la cinétique de germination de mutants affectés au niveau des gènes *CYP707A* exprimés au cours de la germination, *Atcyp707a2.1*, *Atcyp707a3.1* et *Atcyp707a1.1-a2.1*, a été étudiée sur des graines en état de dormance primaire (Fig. 2.9).Ces études ont été réalisées dans les même conditions que pour les graines sauvages présentées Fig 2.8 A, donc à l'obscurité, sauf pour le double mutant *Atcyp707a1.1*-a2 qui a été placé à la lumière. En effet, pour ce dernier, aucune germination n'a pu être observée à l'obscurité en présence ou non de GR24 (données non présentées).

Le mutant *Atcyp707a2.1* germe en absence de GR24 et l'ajout de GR24 améliore la germination dès le 4^{ieme} jour, pour atteindre une augmentation de germination de 21% par rapport au témoin à 8J. De même le double mutant *Atcyp707a1.1-a2.1* répond au GR24. En

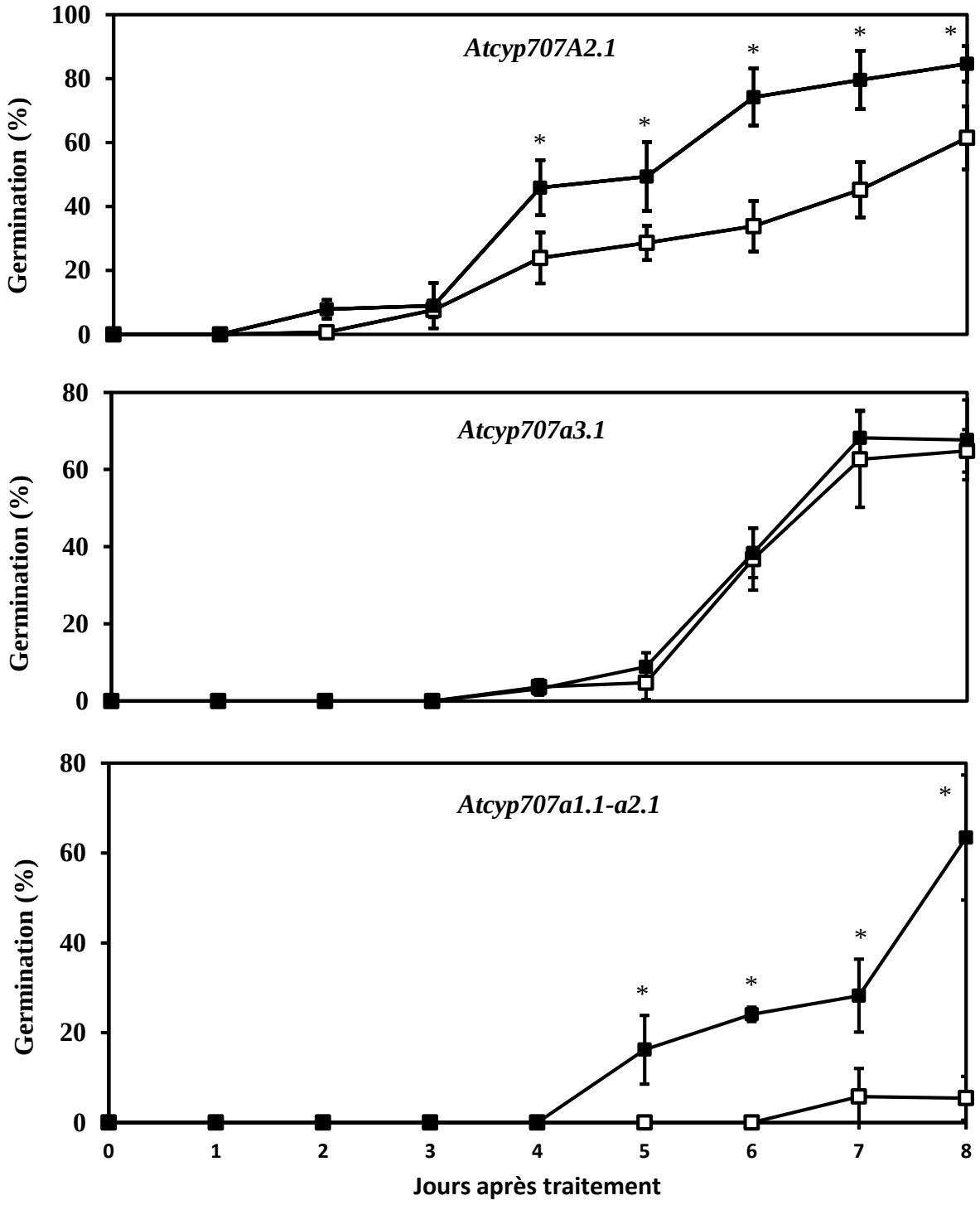


Fig. 2.10 Le gène *AtCYP707A3* est nécessaire à la réponse au GR24 des graines d'*A. thaliana* en dormance primaire.

Les simples mutants *Atcyp707a2* et *atcyp707a3* en dormance primaire sont traités au GR24 2.10^{-5} M (carré noir), à l'obscurité, à 21°C et le double mutant *atcyp707a1.2-a2.1* à la lumière. Le taux de germination est suivi durant 8J. Témoin négatif acétone 0.1% (carré blanc). Les valeurs sont des moyennes ± ES, n=6. Une étoile (*) indique que les valeurs sont significativement différentes du témoin négatif (SNK test, $P < 0.05$).

effet le GR24 entraine une augmentation de la germination des graines de ce mutant de 20 % après 5J et de plus de 3 fois à 8J (Fig. 2.9). Seul le mutant *Atcyp707a3.1* ne présente pas de réponse au GR24 au cours de sa germination (Fig. 2.9). Le gène *AtCYP707A3* est donc nécessaire à cette réponse au SG au cours de la germination chez les graines d'*A. thaliana* en dormance primaire.

Chez *A. thaliana* une réponse au SG est donc présente dans les graines. Cette voie répond à un analogue des SL et la réponse est observée en conditions sub-optimales. L'augmentation du taux de germination enregistrée en réponse au GR24 nécessite la surexpression du gène *AtCYP707A3*. Cette voie semble cependant facultative au cours de la germination d'*A. thaliana*. L'analyse phylogénétique présentée Fig. 2.7 indique par ailleurs que les paralogues exprimés au cours de la germination, *AtCYP707A1, AtCYP707A2* et *AtCYP707A3* sont positionnés dans le sous-groupe 1 Au sein de ce groupe, la distance entre *AtCYP707A3* et les copies SG-dépendantes des *Orobanchaceae* suggèrent par ailleurs, une acquisition précoce de cette voie au sein des Dicotylédones.

3.5 La voie de transduction du signal strigolactone menant à l'expression du gène AtCYP707A3 *au cours de la germination implique* max2.

Les réponses aux SL impliquent dans différents modèles l'activité de la protéine MAX2 ou d'une protéine homologue (Nelson *et al.*, 2008). Dans les conditions précédemment décrites, graines en dormance primaire ou post-maturées, à l'obscurité, le mutant d'*A. thaliana* Col-O *max.2* germe difficilement (Fig. 2. 8) et l'optimisation de la germination en réponse au GR24 n'est pas observée. En présence de lumière, les SL n'induisent pas d'augmentation de la germination (données non présentées). De même le DCL, le 2-PEITC et KAR1 n'induisent pas d'augmentation de germination (Fig. 2. 9A). Par ailleurs, le GR24 n'induit pas de surexpression du gène *AtCYP707A3* (Fig. 2. 9B). Il existe donc bien une voie de signalisation des SG aboutissant à l'expression MAX2-dépendant du gène *AtCYP707A3* au cours de la germination des graines d'*A. thaliana*.

4-Discussion

Nous avons démontré que chez les plantes parasites obligatoires, la germination déclenchée par les SG implique l'induction d'un gène *CYP707A1*, orthologue de *PrCYP707A1* qui entraine potentiellement une dégradation de l'ABA, la levée de dormance puis la germination. Cette voie SG-dépendante est également présente dans les graines de plantes parasites facultatives (*T. versicolor*) et non parasites (*A. thaliana*) mais uniquement en réponse

à un analogue des SL et recrute également un gène *CYP707A*. Chez *A. thaliana*, cette voie SG-dépendante n'augmente la germination que dans des conditions défavorables et implique le gène *Atmax2*.

4-1 CYP707A, induit par les strigolactones au cours de la germination, un acteur conservé.

L'étude de Lechat et collaborateurs (2012) a mis en exergue la surexpression du gène *PrCYP707A1* en réponse au GR24 dans la germination de *P. ramosa*. La surexpression de ce gène ou d'un orthologue est également impliquée dans la germination en réponse aux différents SG chez les plantes parasites obligatoires étudiée. Chez *T. versicolor*, plante parasite facultative, l'orthologue *TvCYP707A1* est également recruté par les SL de même que la copie *AtCYP707A3* chez *A. thaliana*. Pour ces deux dernières espèces, la copie SG dépendante n'est pas la seule exprimée au cours de la germination. En conditions classiques de germination, la réduction du pool d'ABA est dépendante des gènes *AtCYP707A1* et *AtCYP707A2* (Liu et *al.*, 2009, 2010 ; Matakiadis et *al.*, 2009), dont l'induction est sous contrôle de paramètres environnementaux favorables (Penfield *et al*., 2005 ; Oh *et al*., 2006, 2007 ; Holdsworth et *al.*, 2008). De même chez *T. versicolor*, les paralogues *TvCYP707A2* et *TvCYP707A3* sont exprimés au cours de la germination (données non présentées). Par contre la *CYP707A1* inductible par les SG est l'unique mécanisme de dégradation de l'ABA permettant la germination des plantes parasites obligatoires.

D'un point de vue évolutif, c'est l'apparition de *l'haustorium* qui caractérise le passage des plantes non parasites aux plantes parasites. Westwood et collaborateurs (2010) proposent que l'évolution depuis de nombreux *haustoria* latéraux vers un *haustorium* terminal unique caractérise quant à lui le passage des plantes parasites facultatives aux obligatoires. Cette transition, au sein des *Orobanchaceae*, correspond également au passage de la germination sous contrôle abiotique à celle sous dépendance d'un SG. Nous avons montré que les *CYP707A*-SG dépendantes sont des orthologues au sein des *Orobanchaceae* et que ce gène est présent à l'état ancestral. Au cours de l'évolution et de la transition du parasitisme facultatif vers le parasitisme obligatoire, l'expression des gènes *CYP707A* non SG-inductibles dans les graines a vraisemblablement été perdue, mais celle induite par les SG conservée. Cette perte empêche probablement la germination des plantes parasites obligatoires en absence d'un hôte, essentiel à leur survie. Les paralogues non induits par les SG au sein des plantes obligatoires, en absence de pression de sélection pour les conserver, sont probablement devenus des pseudo-gènes.

La nécessité de cette voie SG-dépendante pour la germination des plantes parasites obligatoires s'accompagne d'une évolution de l'inductibilité du gène *CYP707A*, 4 à 10 fois plus

élevée par rapport à *T. versicolor*. De plus, les stimulants de cette voie se diversifient chez les plantes parasites obligatoires, d'un composé analogue des SL à des composés aux structures très diverses (DCL, ITC). Par ailleurs, la sensibilité aux stimulants s'améliore jusqu'à 1 000 000 fois par exemple pour le GR24 passant du µM pour *A. thaliana* (Nelson *et al.*2011,, Toh et *al.*,2011, Lechat *et al.*, 2012) au pM pour *P. ramosa*. Finalement des duplications de l'orthologue SG-dépendant semblent avoir eu lieu au sein des plantes parasites (*PrCYP707A2* et *ShCYP707A2*) soulignant la pression de sélection exercée sur cette dernière au cours de l'évolution des plantes parasites obligatoires.

4-2 La voie SG-dépendante au cours de la germination des plantes parasites facultatives et non parasites, une voie alternative.

Chez les plantes parasites obligatoire, la CYP707A-SG dépendante est la seule conservée pour la germination des graines. Par contre chez *A. thaliana* et *T. versicolor*, la voie SG-dépendante est observable uniquement lors de germinations dans des conditions défavorables. En effet, les SG, essentiellement les SL et les KARs, ont été démontrés comme capables d'induire ou d'améliorer la germination des graines d'*A. thaliana* en dormance primaire (Nelson et *al.*, 2009) ou thermoinhibées (Toh et *al.*, 2011). De plus cette voie est effective lors d'une germination à l'obscurité ce qui appuie les travaux sur les mutant *hy5* qui répondent aux SL à la lumière (Nelson *et al.*, 2011 ; Toh *et al.*, 2012). Les études de Nelson et collaborateurs (2009) et de Toh et collaborateurs (2011) ont par ailleurs mis en évidence que dans ces conditions particulières, les graines d'*A. thaliana* surexprimaient le gène *NCED9* et accumulaient de l'ABA. La stimulation par des SG permettait alors de surexprimer les gènes de synthèse des GA, *GA3ox1* et *Ga3ox2*, aboutissant à une augmentation du taux de germination. Notre étude complète ces travaux, en démontrant que les stimulants de germination permettent une induction du gène *AtCYP707A3* menant vraisemblablement à une réduction du pool endogène d'ABA. La surexpression en réponse au GR24 d'*AtCYP707A3* est aussi observée en condition optimale de germination (données non présentée) mais n'améliore pas la germination. De même chez *T. versicolor*, le GR24 induit la surexpression spécifique du gène *TvCYP707A1*, sans pour autant que celui-ci ait un impact sur le taux de germination. Les conditions de germination défavorables seront à rechercher, afin d'observer une éventuelle amélioration de la germination en réponse au GR24.

La voie SG-dépendante impliquant *AtCYP707A3* est une voie minoritaire dans la germination. En effet la germination du mutant *atcyp707a3* à la lumière ou à l'obscurité est faiblement affectée par rapport sauvage (Nelson *et al.*, 2009). Au contraire, la germination des

mutants *atcyp707a2* ou le double mutant *atcyp707a1.1-a2.1* est fortement altérée (Nelson *et al.,* 2011)

Les gènes *AtCYP707A3* ou *TvCYP707A1* sont exprimés au cours de la germination en présence ou non de SG exogènes. La présence de SL endogènes permet vraisemblablement l'expression de ces gènes au cours de la germination.

Le double mutant *Atcyp707a1.1-a2.1* ne germe pas à l'obscurité avec ou sans SL. Seule la lumière permet de voir une germination et une amélioration de la germination en réponse aux SG. Ceci pourrait s'expliquer par une surexpression d'*AtCYP707A3* en réponse à la lumière (Seo et al. 2006). L'inhibition de la biosynthèse de l'ABA et l'activation de la synthèse des GA par la lumière pourrait expliquer aussi ces observations (Seo *et al.,* 2006). Il est intéressant de remarquer que la régulation par la lumière de *PrCYP707A1* n'est plus effective chez *P. ramosa* (Chap III.3).

4.3 La voie de signalisation des strigolactones aboutissant à l'induction des gènes CYP707A est commune entre les espèces

La voie de signalisation des strigolactones et des karrikines a été démontrée comme dépendante de la protéine MAX2 au cours de la germination d'*A. thaliana* (Nelson et *al.,* 2011 ; Toh et *al.,* 2012). Cette protéine possède un domaine F-box lui permettant, en présence de SL ou de KARs, de reconnaitre le complexe SKP1-Cullin afin de former le complexe d'ubiquitination SCF^{MAX2}-E3 (Waldie et *al.,* 2014 ; Zheng et *al.,* 2014 ; Stirnberg et *al.,* 2007 ; Jiang et *al.,* 2013 ; Zhou et *al.,* 2013). Ce complexe va alors permettre l'ubiquitination de protéines cibles afin de les adresser au protéasome 26S pour dégradation (Waldie et *al.,* 2014). Nous avons mis en évidence l'implication de la protéine MAX2 dans la voie de signalisation des SG aboutissant à l'expression du gène d'*A. thaliana AtCYP707A3*. L'homologie de réponse observée entre *A. thaliana*, *T. versicolor* et les plantes parasites obligatoires, suggère que la voie de signalisation des SG aboutissant à l'expression des gènes *CYP707A* est conservée au sein de ces espèces. De plus un gène *ShMAX2* a été mis en évidence chez *S. hermonthica* et sa fonctionnalité dans la transduction du signal SL vérifiée par complémentation du mutant *Atmax2* (Liu et al., 2014). Des expériences complémentaires réalisées chez *P. ramosa*, ont de plus confirmé l'implication du protéasome 26S dans la voie de transduction des SL menant à la germination de cette plante parasite (Partie développée dans le Chap III-1). Ces résultats soulignent la nécessité de la protéine MAX2 et du protéasome 26S dans la signalisation des SG menant à l'expression d'un gène *CYP707A* au cours de la germination.

4.4 La perception du SG, α/β hydrolases et diversité.

Chez *A. thaliana*, des protéines de la famille des α/β hydrolases, AtD14 et AtKAI2 (D14-like) sont considérées comme les récepteurs putatifs des SG (Hamiaux et *al.*, 2012 ; Waters et *al.*, 2012). Néanmoins, D14 et KAI2 ne semblent pas être impliquées dans les mêmes stades de développement. Alors que KAI2 est impliquée principalement dans la germination, D14 est impliquée dans des stades de développement plus tardifs (Waters et *al.*, 2012 ; Nelson et *al.*, 2011, Tsuchiya et *al.*, 2010). De plus, alors que D14 semble spécifique des SL, KAI2 est capable de reconnaitre à la fois les SL et les KARs, ce qui explique l'impact des karrikines dans la germination d'*A. thaliana* (Waters et *al.*, 2012).

Des expériences de complémentation de mutant d'*A. thaliana Atkai2* par les gènes *PaKAI2* de *P. aegyptiaca* ont permis de démontrer que les protéines codées par les gènes *PaKAI2* permettent la perception des SL au cours de la germination. (Nelson et *al.*, WCPP2012, Sheffield, UK). KAI2 semble donc être un candidat sérieux au titre de récepteur des SL chez les plantes parasites. De plus, une activité hydrolase semble être nécessaire à l'induction de *PrCYP707A1* (Partie développée dans le Chap.III.2).

Cependant, alors qu'*A. thaliana* ne possède qu'un seul gène *KAI2*, *P. aegyptiaca* et *P. ramosa* en possèdent au moins 5 (Partie développée dans le Chap III-2). En mettant cette information en parallèle avec la diversité des molécules induisant la germination des plantes parasites, il parait séduisant de penser que les différents gènes *KAI2* pourraient coder pour les récepteurs aux différents SG chez les plantes parasites. Les résultats suggèrent alors l'existence d'une voie de signalisation des SL ancestrale dans laquelle une protéine MAX2, et plusieurs D14-like seraient déjà présents. Les D14-like auraient alors évolué permettant de reconnaitre d'autres types de molécule de type SL-like chez les plantes parasites obligatoires. Ce phénomène participerait à la diversité des spécificités d'interactions plante hôte-plante parasite et à la spéciation.

Chapitre III

La voie de transduction du signal strigolactone : De la perception à la germination

Introduction

En réponse aux SL, la germination de *P. ramosa* implique la surexpression du gène *PrCYP707A1* (Lechat et *al.*, 2012). Pour autant, chez notre modèle d'étude la voie de transduction du signal SL permettant l'induction de ce gène est inconnue. Ne disposant ni de mutants ni de technique de transformation, une approche par homologie avec la plante modèle *A. thaliana* a alors été envisagée. Il a en effet été démontré chez *A. thaliana* qu'une application exogène de SL lors de la germination entraine une surexpression du gène *AtCYP707A3* (Chap II). Par ailleurs, chez *A. thaliana* ainsi que chez d'autres plantes modèles, de nombreuses avancées ont eu lieu ces dernières années dans l'élucidation des acteurs de la voie de transduction du signal SL contrôlant différents processus tels que la ramification aérienne ou la germination.

Dans la première partie de ce chapitre, l'implication de deux acteurs centraux de la réponse aux SL présents chez d'autres modèles a été explorée lors de la germination de *P. ramosa*. À l'aide d'approches pharmacologiques et moléculaires, l'implication potentielle du protéasome 26S, partie intégrante du complexe SCF^{MAX2}, ainsi que des récepteurs putatifs des SL, les protéines α/β hydrolases D14 et KAI2, sont présentées.

Dans la seconde partie, l'étude se portera sur des facteurs externes décrits comme étant capables d'induire l'expression des gènes *CYP707A* chez certaines espèces. Ainsi, chez *A. thaliana*, au cours de l'imbibition, l'expression des gènes *CYP707A* peut être régulée par différents facteurs externes comme la lumière et le stress oxydatif en absence de SL (Liu et *al.*, 2009 ; 2010). L'effet de ces facteurs externes en tant que signaux régulateurs de l'expression du gène *PrCYP707A1* au cours de la germination de *P. ramosa* peut donc être suspecté. L'impact de ces facteurs et leurs possibles influences sur la transduction du signal SL sont ensuite exposés.

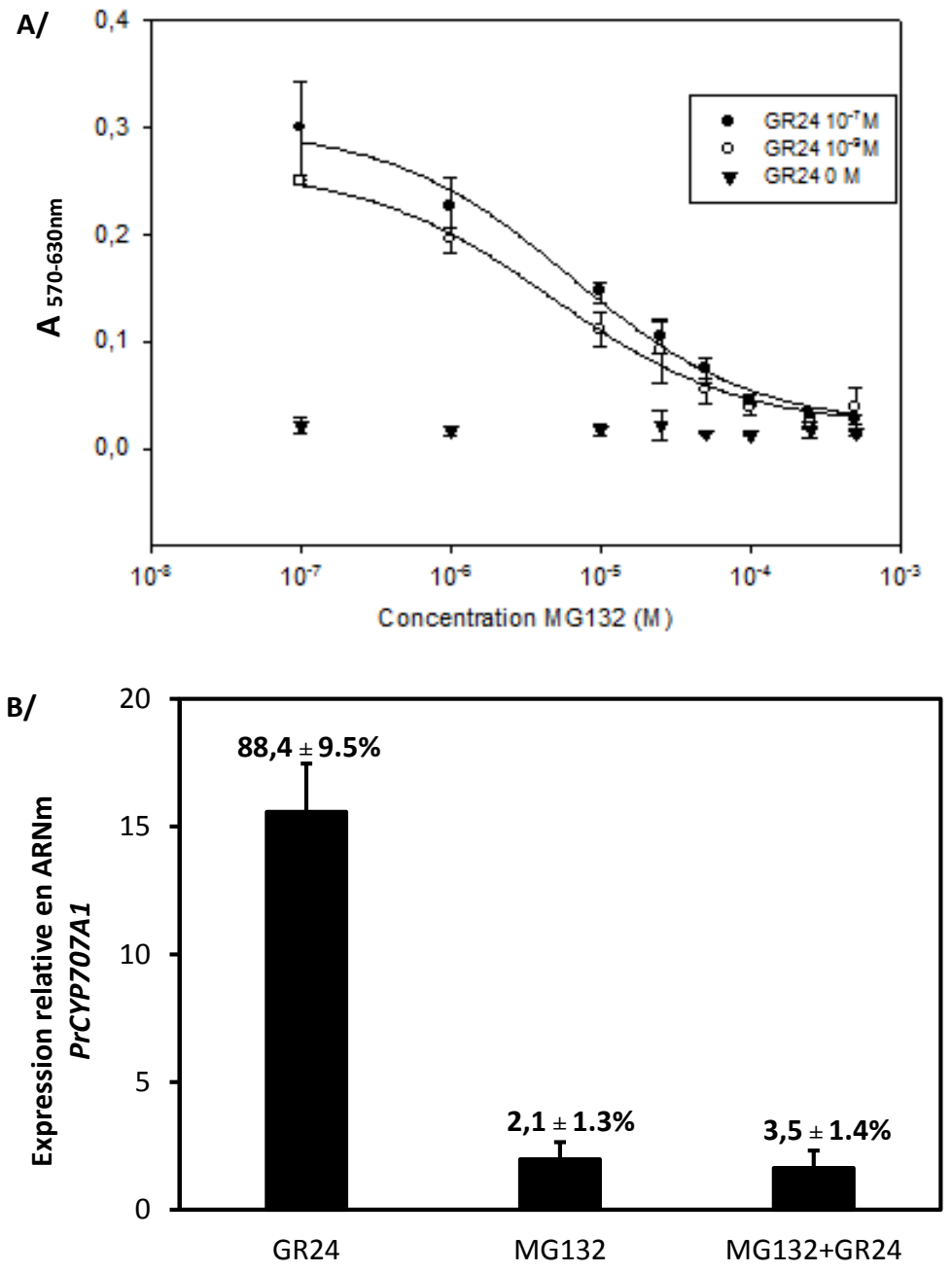


Fig. 3.1 Implication du protéasome 26S dans la germination de *P. ramosa* et l'expression du gène *PrCYP707A1* en réponse aux strigolactones.

Des graines conditionnées 7J : **A/** Sont traitées de manière conjointe avec différentes concentrations en MG132, et du GR24 à 1.10^{-7} ou 10^{-9} M. Le taux de germination est déterminé par absorbance 3J après stimulation, selon le protocole de Pouvreau *et al.*, 2012 (annexe 1). **B/** Sont traitées avec du MG132 à 100 µM et du GR24 à 1.10^{-9} M. Les graines ont été récoltées 6 h après stimulation, et un aliquote a été conservé pour estimer le taux de germination 3J (Lechat *et al.*, 2012, Chap I). Les taux d'expression sont obtenus en comparaison avec des graines non stimulées, (SNK P<0,05) et normalisé par l'expression du gène Ef1-α. Les chiffres au-dessus des histogrammes représentent le taux de germination. Toutes les données sont présentées comme des moyennes ± SE (n=3, SNK P<0.05). Le protocole de conditionnement, de germination et de RT-PCR sont réalisés selon Lechat et *al.*, 2012.

1. Le protéasome 26S, un acteur de la transduction du signal strigolactone dans la germination de *P. ramosa*

Les études portant sur la voie de signalisation des SL chez différentes espèces modèles ont permis d'identifier différents acteurs impliqués dans la transduction du signal. La reconnaissance des SL par une α/β hydrolase permet dans un premier temps sa liaison à une protéine F-box MAX2 (Hamiaux et *al.*, 2012 ; Zhou et *al.*, 2013). L'ensemble α/β hydrolase-MAX2 est alors capable de reconnaitre les partenaires SKP1-Cullin pour former un complexe fonctionnel d'ubiquitination SCF^{MAX2} ubiquitine ligase E3 (SCF^{MAX2}-E3) (Waldie et *al.*, 2014 ; Zheng et *al.*, 2014 ; Jiang et *al.*, 2013). Ce complexe réalise l'ubiquitination des protéines cibles, permettant leurs adressages au protéasome 26S pour dégradation. Or, nous avons démontré que l'expression du gène d'*A. thaliana AtCYP707A3* peut être régulée par les SL d'une manière MAX2 dépendante (Chap II). Par homologie, il est alors envisageable que le protéasome 26S soit impliqué dans l'expression du gène *PrCYP707A1* en réponse aux SL lors de la germination de *P. ramosa*. Nous avons étudié cette implication à l'aide d'une approche pharmacologique, en évaluant l'effet d'un inhibiteur spécifique du protéasome 26S, le MG132, sur la germination et l'expression du gène *PrCYP707A1* SL-dépendantes (Fig. 3.1).

L'approche pharmacologique réalisée a consisté dans un premier temps à déterminer le taux de germination de graines traitées de manière conjointes au MG132 de 1.10^{-3} à 1.10^{-7} M et au GR24 à 1.10^{-7} et 1.10^{-9} M (Fig. 3.1A). Une inhibition totale de la germination est observée pour une concentration de 100µM en MG132, indépendamment de la concentration en GR24. L'IC_{50} du MG132 est alors de $4{,}69.10^{-5} \pm 1{,}54.10^{-5}$ M. Un lavage suivi d'une nouvelle stimulation par le GR24 (10^{-9} M) permet une germination à un taux comparable à celle du contrôle (non présenté). Les traitements MG 132 utilisés sont donc non létaux et réversibles.

L'impact de cet inhibiteur sur l'expression du gène *PrCYP707A1* a ensuite été déterminé pour des concentrations de 100 µM en MG132 et 1.10^{-9} M en GR24, inhibant totalement la germination (Fig. 3.1B). L'expression du gène *PrCYP707A1* est quantifiée 6 h post traitement et le pourcentage de germination est déterminé sur un aliquote 3 jours post traitement. Alors que les graines traitées au GR24 ont un taux de germination de 88,4 ± 9,5%, et une surexpression du gène *PrCYP707A1* de 15,7 ± 1,88 fois comparé à des graines non stimulées, celles traitées au MG132 ne présentent ni germination (3,5 ± 1,4%), ni surexpression du gène *PrCYP707A1* (1,9 ± 0,7). Le MG132 inhibe donc à la fois la surexpression du gène *PrCYP707A1*, et la germination des graines de *P. ramosa* en réponse aux SL. L'activité du

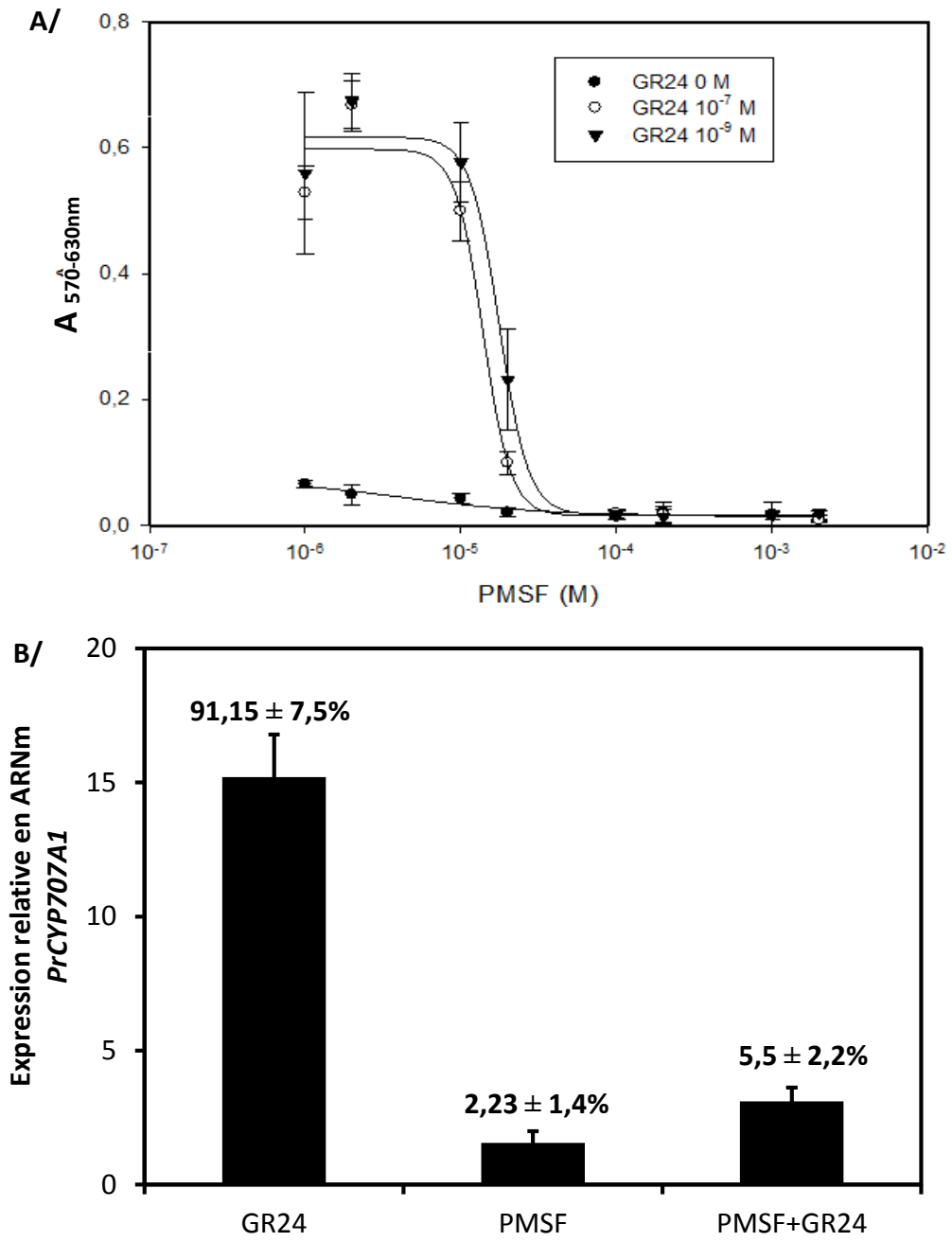


Fig. 3.2 Les α/β hydrolases, acteurs de la germination des graines de *P. ramosa*.

Des graines conditionnées 7J : **A/** Sont mises en présence de PMSF à différentes concentration durant 30 min, avant d'être stimulées par du GR24 à 1.10^{-7} et 10^{-9} M. Le taux de germination est déterminé par absorbance 3J après stimulation selon le protocole de Pouvreau *et al.,* 2012 (annexe 1). **B/** Sont traitées avec du PMSF à 400 µM durant 30 min avant d'être stimulées avec du GR24 à 1.10^{-9} M. Les graines ont été récoltées 6 h après stimulation, et un aliquote a été conservé pour estimer le taux de germination à 3J (Lechat *et al.,* 2012, Chap I). Les taux d'expression sont obtenus en comparaison avec des graines non stimulées, (SNK P<0,05) et normalisé par l'expression du gène Ef1-α. Les chiffres au-dessus des histogrammes représentent le taux de germination. Toutes les données sont présentées comme des moyennes ± SE (n=3, SNK P <0,05). Le protocole de conditionnement, de germination et de RT-PCR sont réalisés selon Lechat et *al.,* 2012 (Chap I).

protéasome 26S est donc nécessaire à la germination des graines de *P. ramosa*, il est impliqué dans la cascade de transduction des SL permettant l'expression du gène *PrCYP707A1*.

L'implication du protéasome 26S dans la voie de transduction des SL chez *P. ramosa* met en évidence un processus conservé dans les différents modèles de réponse aux SL décrits à ce jour (Jiang et *al.,* 2013 ; Stanga et *al.,* 2013 ; Kong et *al.,* 2014). Cette signalisation passe par la dégradation de protéines cibles par le protéasome 26S. La dégradation d'un facteur de transcription, inconnu à ce jour, permettrait alors l'expression du gène *PrCYP707A1* en réponse aux SL. Cette homologie avec la voie de transduction du signal SL chez *A. thaliana* vient compléter celle déjà suggérée au niveau du rôle de MAX2 chez *P. ramosa* (Chap II) et chez *S. hermonthica* (Liu et *al.,* 2014). Ces résultats suggèrent donc la possible implication d'un complexe SCF^{MAX2}-E3 dans la réponse aux SL chez *P. ramosa*.

2. Les α/β hydrolases récepteurs putatifs des strigolactones chez *P.ramosa*

Le(s) récepteur(s) intra cellulaire(s) aux SL identifié(s) à ce jour est (sont) une (des) protéine(s) de la famille des α/β hydrolases, telles que D14 ou KAI2 (Hamiaux et *al.,* 2012 ; Waters et *al.,* 2012, 2013, 2014). Partant des modèles préalablement proposés, l'implication des protéines de type α/β hydrolases dans la germination de graines de *P. ramosa* et l'induction du gène *PrCYP707A1* en réponse aux SL a dans un premier temps été étudiée par une approche pharmacologique.

L'effet de l'acide phénylmethane sulfonique (PMSF), un inhibiteur des activités hydrolases (Gaiji et *al.,* 2012), a alors été testé au cours de la germination de *P. ramosa* afin de vérifier la nécessité d'une activité hydrolase lors de ce processus (Fig. 3.2). Le PMSF a été testé pour des concentrations comprises entre 1.10^{-6} et 5.10^{-3} M et laissé en incubation 30min avant l'ajout de GR24 à 10^{-7} et 10^{-9} M (Fig. 3.2 A). Les résultats obtenus ont mis en évidence que le PMSF est capable d'inhiber totalement la germination de *P. ramosa* (96 ± 7,2%) pour une concentration supérieure ou égale à 5.10^{-4} M, quelle que soit la concentration en GR24 testée. Le PMSF présente une IC_{50} de $1,6 \pm 0,3.10^{-5}$ M et des concentrations élevées de GR24 (10^{-5} M) ne surmontent pas l'inhibition générée par le PMSF. Un lavage suivi d'une seconde stimulation avec du GR24 à 1.10^{-9} M permet d'obtenir des taux de germination comparable à ceux du témoin (non présenté), l'effet inhibiteur du PMSF est donc non létal et réversible pour des concentrations inférieures à 1.10^{-4} M. Une activité hydrolase est donc nécessaire à l'induction de la germination des graines de *P. ramosa* par les SL.

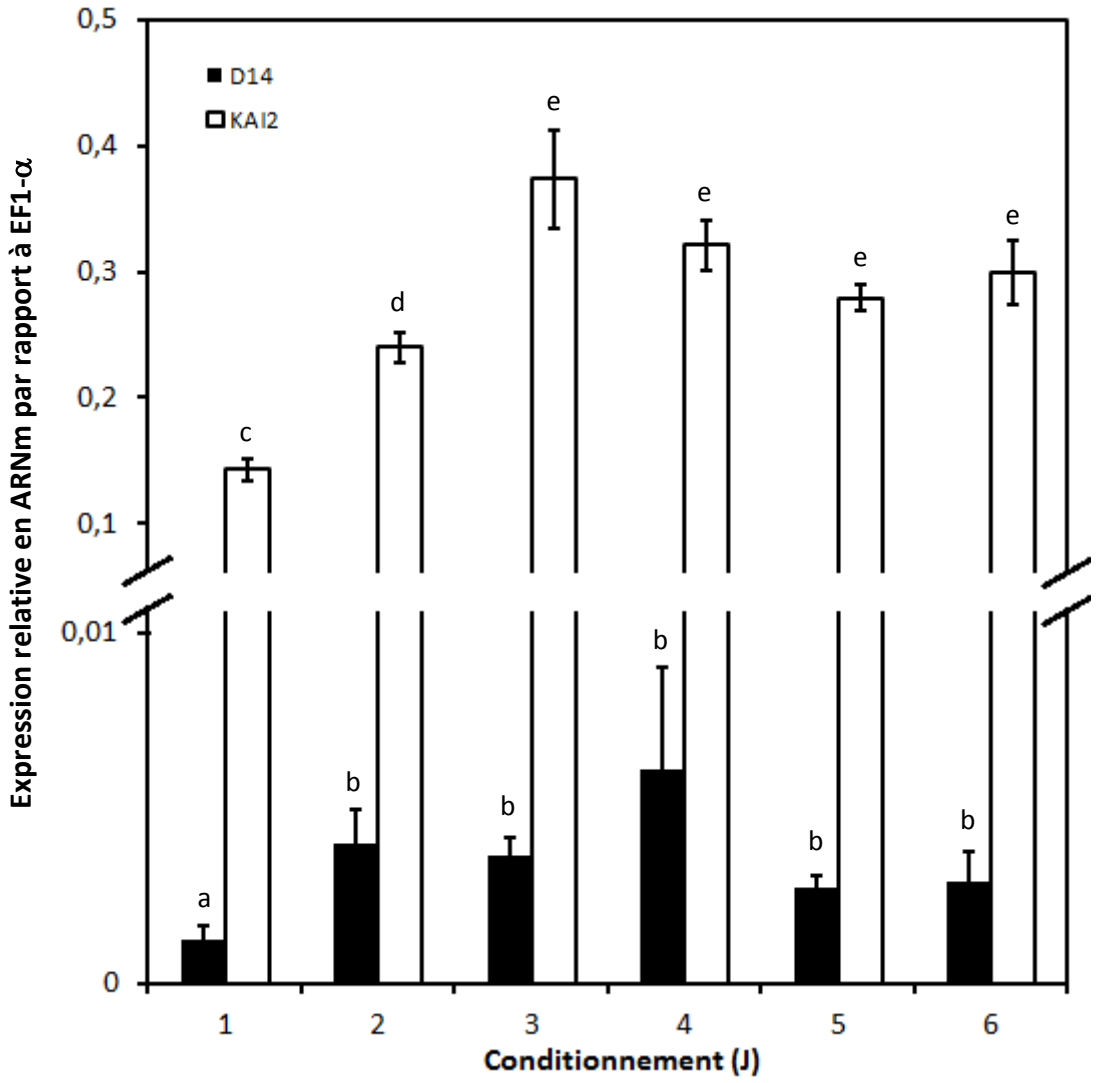


Fig. 3.3 Les α/β hydrolases *PrD14* et *PrKAI2* sont surexprimées au cours du conditionnement.

Les profils d'expression des gènes *PrKAI2* et *PrD14* sont suivis jour à jour au cours des 6 premiers jours de conditionnement. Les expressions relatives sont exprimées par la méthode du Δ CT (threshold cycle) en fonction de l'expression du gène contrôle EF1-α (EF1-α=1). Le gène contrôle présente une variation inférieure à 0,25 CT entre les différents échantillons. Toutes les données sont présentées comme des moyennes ± SE (n=3). Les taux d'expression avec la même lettre ne diffèrent pas significativement (SNK P<0,05). Amorces utilisées : *PrD14 Up* 5'GGCGCTTCCCCAAGGTT3' ; *PrD14 Do* 5'TCGATDTDTDDATGDTDGAA3' ; *PrKAI2 Up* 5'CGCGATGGAAACGAACTACTATT3' ; *PrKAI2 Do* 5'CATGTCGCTGCCGATCAC3'. Les protocoles de conditionnement et de RT-PCR sont réalisés selon Lechat et *al.,* 2012 (Chap I).

L'expression du gène *PrCY707A1* a alors été quantifiée en condition d'inhibition (PMSF 4.10^{-4} M / GR24 1.10^{-9} M) et comparée aux contrôles (Fig. 3.2B). Les résultats obtenus montrent que les graines stimulées par le GR24 présentent une surexpression du gène *PrCYP707A1* de 15,5 ± 1,7 fois par rapport à des graines non stimulées, et un taux de germination de 91,2 ± 7,5 %. En revanche, les graines traitées au PMSF et stimulées par le GR24 ne présentent plus qu'une surexpression du gène *PrCYP707A1* de 3,1 ± 0,5 fois et une germination résiduelle de 5,5 ± 2.2 %. L'activité hydrolase inhibée par le PMSF est donc nécessaire à la transduction du signal de la perception du GR24 à la surexpression de *PrCYP707A1*.

Après avoir démontré l'implication d'activité hydrolase dans la transduction du signal SL chez *P. ramosa*, les éventuels orthologues des gènes codants les α/β hydrolases D14 et/ou KAI2 ont été recherchés et leurs profils d'expression étudiés. Afin de les identifier, une banque d'ADNc a été réalisée sur les différents stades de développement de *P. ramosa*. Parmi les 68254 contigs obtenus, différentes séquences codants des hydrolases ont pu être identifiées. L'une d'entre elle, nommée *PrD14*, est une séquence codante complète de 801 pb présentant un degré d'homologie de séquence de 69% avec *AtD14* (AT3G03990). Cinq autres séquences codantes ont également été mises en évidence, *PrKAI2.1 à PrKAI2.5*, de 810 à 825pb (séquences disponible en annexe 2) présentant de fortes homologies de séquence entre elles (de 63 à 75%) et avec l'orthologue *AtKAI2* (AT4G37470) d'*A. thaliana* (de 62 à 68%).

Dans le cadre d'une première approche, les expressions des gènes *PrKAI2* et *PrD14* ont été suivis au cours du conditionnement (Fig. 3.3). Dans le cas *PrKAI2*, celle-ci ont été étudiées de manière globale à l'aide d'amorces non spécifiques, ne permettant pas de différencier les différentes formes. Les profils d'expression de *PrKAI2* montrent une surexpression dès le deuxième jour (1,9 fois), avec un pic atteint au troisième jour (3,5 fois) puis reste stable au cours du conditionnement. Dans le cas de *PrD14*, celui-ci ne montre une surexpression qu'au second jour (1.6 fois), puis reste stable sur le reste de la période de conditionnement. En outre, le rapport d'expression entre *PrKAI2* et *PrD14* indique que *PrKAI2* est 40 fois plus exprimé que *PrD14* au 1er jour, et jusqu'à 66 fois plus exprimé le 3ème jour.

L'existence chez *P. ramosa* des orthologues de ces α/β hydrolases, leurs expressions au cours du conditionnement, ainsi que la nécessité d'une activité hydrolase dans la réponse aux SL confortent l'hypothèse de l'implication de protéines de type α/β hydrolases en tant que récepteurs des SL dans la germination des graines de *P. ramosa*. Cependant, le PMSF ayant un

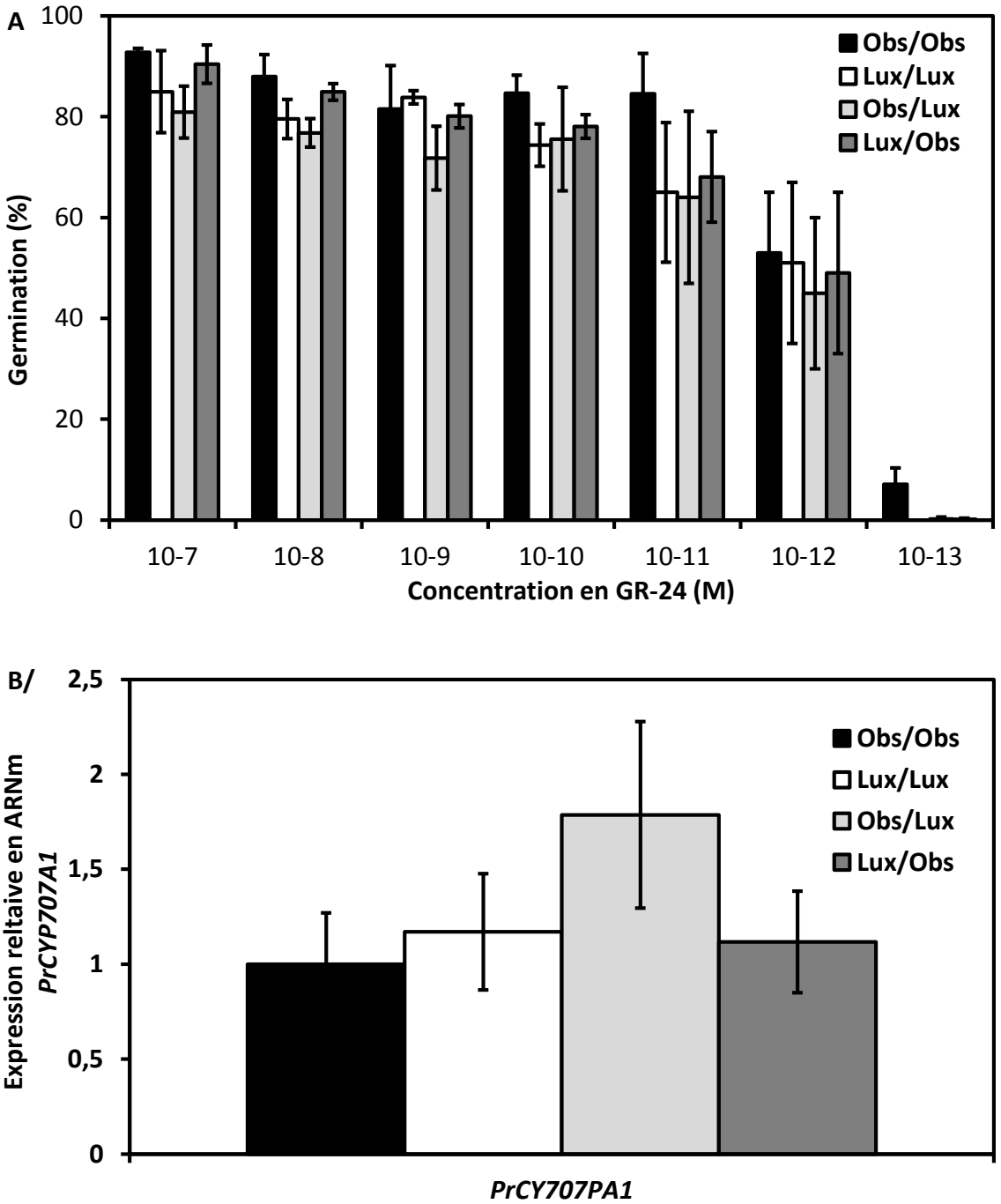


Fig. 3.4 La lumière n'impacte pas de manière significative la germination de *P. ramosa*.

A/ Effet de la lumière sur le taux de germination à différentes concentrations en GR24. **B/** Effet de la lumière sur l'expression du gène *PrCYP707A1* à une concentration en GR24 de 1.10^{-9} M. Deux conditions sont testées, l'impact de la lumière durant le conditionnement, ou/et après stimulation : Conditionnement/Stimulation. Le taux de germination est évalué 3J après stimulation. Source lumineuse OSRAM L 58w Warm white à 5200°K, 200µMol de photon P.A.R/m². Obs: Obscurité ; Lux: lumière. Toutes les données sont présentées comme des moyennes ± SE (n=3). Une étoile (*) montre un résultat significativement différent du contrôle Obs/Obs (SNK $P<0.05$), après normalisation par l'expression d'EF1-α. Les protocoles de conditionnement, de germination et de RT-PCR sont réalisés selon Lechat et *al.*, 2012 (Chap I).

large spectre d'inhibition, ces expériences seules ne suffisent pas à démontrer l'implication formelle de ces protéines. Cette hypothèse est néanmoins confortée par diverses études chez *A. thaliana* – chez qui KAI2 a été démontré comme étant essentiel à la perception des SL au cours de la germination (Waters et *al.,* 2012) – mais également chez les plantes parasites. En effet, Nelson et ses collaborateurs ont démontré que lorsque le mutant *A. thaliana kai2* est complémenté avec les gènes *KAI2* de *P. aegyptiaca* ou *S. hermonthica*, la sensibilité aux SL au cours de la germination est restaurée (Nelson WCPP2012, Sheffield, UK). Fait intéressant, lors de cette complémentation, la sensibilité aux Karrikines n'est pas rétablie (Nelson WCPP2012, Sheffield, UK). Ceci est en accord avec le fait que nous n'avons pas observé, dans nos conditions, une stimulation de la germination de *P. ramosa* par les karrikines (Chap II). Ces résultats permettent donc de proposer que les α/β hydrolases KAI2 des plantes parasites sont spécifiquement impliquées dans la voie de transduction des SL au cours de la germination.

KAI2 étant le récepteur putatif des SL et des Karrikines lors de la germination, une seconde hypothèse peut également être formulée. En effet, alors qu'*A. thaliana* ne possède qu'un seul gène KAI2, *P. ramosa* en possède au moins cinq. Or *A. thaliana* est capable de ne percevoir que les SL et les karrikins *via* KAI2, là ou *P. ramosa* est capable de percevoir des stimulants de natures différentes (ITC, DCL, SL), lors de la germination. On peut donc émettre l'hypothèse que les différentes protéines KAI2 de *P. ramosa* pourraient être des récepteurs permettant la perception de ces stimulants de germination variés.

3. Impact d'un traitement lumineux sur la germination des graines de *P. ramosa*

La germination des graines de nombreuses plantes peut être impactée de manière positive ou négative par la lumière. Chez *A. thaliana* cette dernière stimule la germination par l'activation du phytochrome A (PHYA) induisant la dégradation du facteur de transcription PIL5 (PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR3-LIKE5) (Oh et *al.,* 2006). Le facteur de transcription PIL5 réprime entre autres l'induction des gènes de catabolisme de l'ABA dont *AtCYP707A2* et les gènes codant les enzymes de la synthèse des GA tels que les *GA3ox* (Penfield *et al*., 2005 ; Oh *et al*., 2006, 2007 ; Holdsworth et *al.,* 2008). En parallèle, PIL5 stimule la biosynthèse de l'ABA par induction des gènes *NCED* (*AtNCED6* et *AtNCED9*) et le catabolisme des GA *via* les gènes *GA2ox* (Oh *et al*., 2006 ; Holdsworth et *al.,* 2008). En revanche, chez d'autres espèces la lumière inhibe la germination. Ainsi, chez *O. minor* la présence de lumière blanche inhibe partiellement la germination de l'ordre de 40% et de 20%

en réponse aux SL lorsque la lumière est appliquée durant la phase de conditionnement ou de stimulation, respectivement (Takagi et *al.,* 2009). Cette signalisation ferait intervenir un unique phytochrome *OmPHYA*, dont l'expression est réprimée en présence de lumière (Takagi et *al.,* 2009). L'intégration de ce signal lumineux dans la réponse aux stimulants de germination éviterait aux graines de plantes parasites de germer à la surface du sol dans des conditions peu favorables à leur développement. Par ailleurs, l'interaction des voies de signalisation du signal lumière et de la voie des SL a été décrite dans plusieurs phénomènes comme l'élongation de l'hypocotyle (Jia et *al.,* 2014), le syndrome d'évitement de l'ombre (Finlayson et *al.,* 2010), ou encore la germination en réponse aux karrikines (Nelson et *al.,* 2009 ; 2010).

Afin d'étudier l'impact de la lumière sur la germination des graines de *P. ramosa* en réponse aux SL, la lumière (OSRAM L 58w Warm white à 5200°K, 200µMol de photon P.A.R/m², lumière continue) est appliquée pendant le conditionnement et/ou après stimulation par le GR24. Les 3 combinaisons : lumière durant les deux phases (Lux/Lux) ; lumière durant le conditionnement (Lux/Obs) ; et lumière durant la stimulation (Obs/Lux) sont comparées aux graines témoins maintenues à l'obscurité tout au long du processus de germination (Obs/Obs). Pour chacun de ces traitements le pourcentage de germination est déterminé pour des concentrations en GR24 allant de 10^{-7} à 10^{-13} M (Fig. 3.4A). L'expression du gène *PrCYP707A1* a été quantifiée après 7 jours de conditionnement suivi de 6h de traitement au GR24 (10^{-9}M) pour les différentes conditions, et comparée au témoin (Obs/Obs) (Fig. 3.4B).

En l'absence de GR24 ou à des concentrations inférieures à celle perçues par les graines (10^{-13} M), la lumière ne stimule pas la germination des graines de *P. ramosa* (Fig. 3.4A). De même, les différents traitements lumineux appliqués n'impactent ni la germination des graines de *P. ramosa* en réponse aux différentes concentrations de GR24, ni l'expression du gène *PrCYP707A1* (Fig. 3.4B). On peut donc en conclure que chez *P. ramosa* la voie de signalisation des SL n'intègrerait pas le facteur lumière dans la surexpression du gène *PrCYP707A*1.

Chez *A. thaliana*, les gènes *AtCYP707A1* et *AtCYP707A2* sont impliqués dans la réduction du pool d'ABA lors de la levée de dormance et la germination en présence de lumière (Okamoto et *al.,* 2006). Au cours de l'imbibition, ces gènes peuvent être surexprimés par l'exposition à la lumière, ce qui permet alors de stimuler la germination (Kushiro et *al.,* 2004 ; Penfield et *al.,* 2005). Par ailleurs, outre l'effet de la lumière, l'application de SL durant la germination d'*A. thaliana* entraine la surexpression du gène *AtCYP707A3* (Chap II). Pour autant, une surexpression du gène *AtCYP707A3* est observée chez des graines d'*A. thaliana* placées à l'obscurité et mis en présence de SL. Il est donc possible d'en déduire que la lumière n'est pas indispensable à la surexpression du gène *AtCYP707A3* MAX2-dépendante en réponse

aux SL (Chap II), et que l'intégration du signal lumineux n'est donc pas nécessaire à la voie de signalisation des SL aboutissant à la surexpression d'*AtCYP707A3*. La voie de signalisation des SL dans notre modèle d'étude, *P. ramosa*, semble donc similaire à celle présente chez *A. thaliana* qui recrute le gène *AtCYP707A3* de manière MAX2 dépendante en absence de lumière.

4. Impact d'un stress oxydatif sur la germination des graines de *P. ramosa*.

Outre la lumière, d'autres facteurs tels que les espèces réactives d'oxygènes (ROS) permettent également de promouvoir la germination. Chez *A. thaliana*, du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et du monoxyde d'azote (NO) sont produits de manière endogène lors de l'imbibition de la graine. Ces deux composés permettent une surexpression d'un gène de catabolisme de l'ABA (*AtCYP707A2*) et des gènes de biosynthèse des GA, permettant la levée de dormance et la germination (Liu et *al.*, 2009, 2010 ; Matakiadis et *al.*, 2009). Le nitrate exogène est également connu pour promouvoir la germination, son mode d'action passant par la génération d'un stress oxydatif médié par la voie du NO (Bethke et *al.*, 2006) (Fig. I.11). Chez *P. ramosa*, une Gluthation-S-transferase et une catalase sont surexprimées en réponses au GR24 (TDF44 et 49 respectivement ; Lechat et *al.*, 2012). Ces surexpressions suggèrent qu'un stress oxydatif peut avoir eu lieu lors de la stimulation des graines de *P. ramosa* par le GR24. À ce jour l'implication d'un stress oxydatif dans les processus de réponses au SL dans les autres modèles n'a cependant pas été mise en évidence. Afin de tester l'implication possible d'un stress oxydatif dans la signalisation des SL et la surexpression du gène *PrCYP707A1*, une approche pharmacologique a été réalisée. Les effets sur la germination de trois générateurs de NO, le SNP, l'H_2O_2 et le SNAP (Murgia et *al.*, 2004), et de deux inhibiteurs de l'accumulation de NO, le L-NAME inhibiteur des NO synthase, et le c-PTIO piégeur de NO (Goldenstein et *al.*, 2003), ont été étudiés.

Des graines conditionnées de *P. ramosa* ont alors été traitées avec ces molécules en présence ou non de GR24 (Fig. 3.5A). Utilisés seuls, les générateurs de NO ne stimulent pas la germination de *P. ramosa* sur la gamme de concentrations testées (10 à 200 µM) par rapport au témoin non stimulé (0 µM ; 6 ± 4% ; Fig. 3.5A). Le SNP et le SNAP, en traitement concomitant avec du GR24 (10^{-9} M) n'altèrent pas la germination (SNP et SNAP à 200µM, 65 ± 9% et 58 ± 12%, respectivement) par rapport au témoin positif GR24 1.10^{-9} M seul (69 ± 11%). Cependant, le taux de germination chute à 37 ± 12% en présence de 200µM d'H_2O_2 (Fig. 3.5A). Après traitement à l'H_2O_2, une seconde stimulation (GR24, 10^{-9} M) permet d'obtenir un taux de

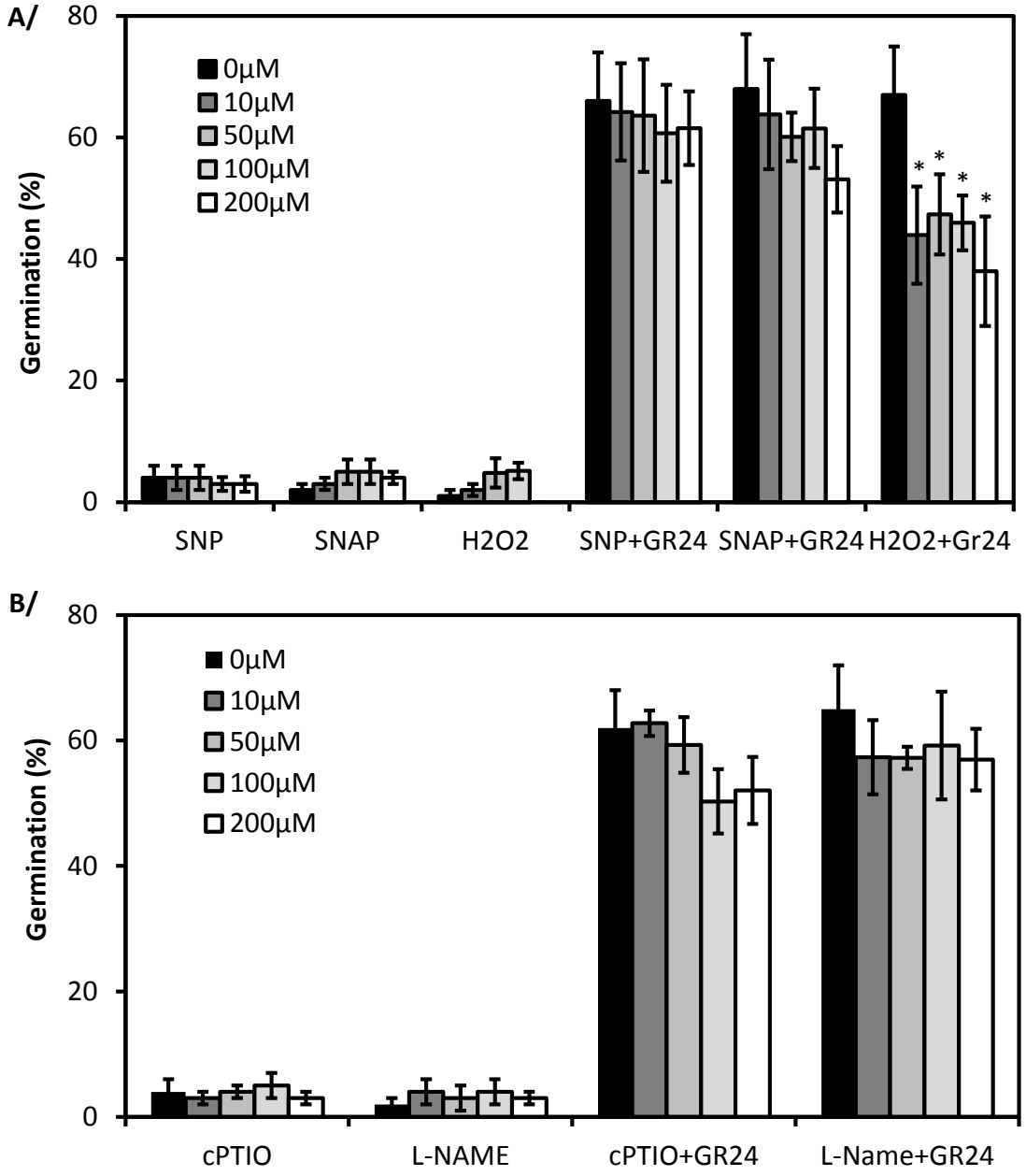


Fig. 3.5 Un stress oxydatif médié par la voie du NO n'impacte pas significativement la germination des graines de *P. ramosa*.

Des graines conditionnées 7J : **A/** Sont mises en présence de trois générateur de NO, le SNP, le SNAP ou l'H_2O_2 à des concentrations allant de 10 à 200 µM, avec ou sans GR24 à 1.10^{-9} M en traitement concomitant. **B/** Sont mises en présence d'un piégeur de NO, le cPTIO, ou d'un inhibiteur de NO synthase, le L-NAME à de concentrations allant de 10 à 200 µM, avec ou sans GR24 à 1.10^{-9} M en traitement concomitant. Les taux de germination sont déterminés 3J après traitement (Lechat et *al.*, 2012). Toutes les données sont présentées comme des moyennes ± SE (n=3). Une étoile (*) montre un taux de germination significativement différent du contrôle non traité, ou traité au GR24 seul (SNK $P<0.05$). SNP: Sodium NitroPrussiate ; SNAP: S-Nitroso-N-acetyl-DL-penicillamine ; L-NAME: Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride ; cPTIO: Carboxy Potassium Tetramethyl Imidazole Oxyde. Les protocoles de conditionnement et de germination sont réalisés selon Lechat et *al.*, 2012 (Chap I).

germination identique à celui du contrôle. Les générateurs de NO utilisés ne présentent donc pas d'effet toxique sur les graines. L'inhibition observée suite au traitement à l'H_2O_2 est donc vraisemblablement liée à un effet direct oxydant de l'H_2O_2 sur le GR24 plutôt qu'à la génération de NO. De même, les traitements au L-NAME et c-PTIO sur des gammes de concentrations de 10 à 200 µM, n'induisent ni une germination différente du témoin non stimulé (4 ± 3% ; Fig. 3.5B) lorsqu'ils sont utilisés seuls, ni l'inhibition de la germination en traitement conjoint avec le GR24 (moyenne de 58 ± 10% quel que soit le traitement et la concentration) par rapport au témoin positif (67 ± 10% ; GR24 10^{-9} M ; composé 0µM). Les générateurs et inhibiteurs d'accumulation du NO n'affectent donc pas la germination de *P. ramosa* contrairement à celle d'*A. thaliana*. Un stress oxydatif médié par la voie du NO ne semble donc pas être impliqué dans la voie de transduction des SL conduisant à la germination des graines de *P. ramosa* en réponse au GR24.

Chez *A. thaliana*, plusieurs études ont démontré que les stimuli endogènes ou exogènes impliquant la voie du NO impactaient de manière majoritaire l'expression d'*AtCYP707A2* (Matakiadis et *al.*, 2009 ; bethke et *al.*, 2006 ; Liu et *al.*, 2010). En outre, les mutants *Atcyp707a1* et *Atcyp707a3* post maturés d'*A. thaliana* ne présentent pas de modification du phénotype dans la germination en réponse au NO (Liu et *al.*, 2009). Les gènes *AtCYP707A1* et *AtCYP707A3* ne sont donc pas nécessaires à la germination en réponse au NO, contrairement à *AtCYP707A2*. Or, lors d'un traitement aux SL chez *A. thaliana*, l'amélioration du taux de germination passe par la surexpression du gène *AtCYP707A3* (Chap II). De plus, les résultats obtenus lors de cette étude permettent de conclure qu'un stress oxydatif médié par la voie du NO n'est pas impliqué dans la voie de transduction des SL aboutissant à la surexpression de *PrCYP707A1* et à la germination des graines de *P. ramosa*. Une comparaison supplémentaire est donc possible entre *AtCYP707A3* et *PrCYP707A1*, appuyant l'hypothèse que les plantes parasites auraient évolué en ne conservant uniquement que la voie d'induction du catabolisme de l'ABA en réponses aux stimulants de germination.

La surexpression des TDF44 et 49, codant respectivement pour une Gluthation-S-transferase et une catalase en réponse aux SL semble donc reliée à une reprise métabolique et à une protection vis-à-vis des espèces réactives d'oxygène et non à la voie de signalisation des SL.

Conclusion

L'étude réalisée sur l'impact des paramètres externes tend à démontrer que dans nos conditions et sur notre modèle, la lumière et le stress oxydatif médié par la voie du NO ne participent pas à la surexpression du gène *PrCYP707A1* en réponses aux SL On peut donc en conclure que ces facteurs ne sont pas intégrés dans la voie de transduction des SL amenant à la germination de *P. ramosa*. Ces résultats confortent alors ceux obtenus lors du chapitre 2 précédent dans lequel nous avons montré qu'il existe, chez *A. thaliana*, un gène *CYP707A* (*AtCYP707A3*) qui répond de manière spécifique aux SL au cours de la germination. On peut donc émettre l'hypothèse qu'au cours de l'évolution, les plantes parasites auraient perdu les gènes *CYP707A* répondant à l'environnement, *AtCYP707A1* et *AtCYP707A2* (Liu et *al.*, 2010), pour ne conserver que la version du gène spécifiquement régulé par les SL, *AtCYP707A3*. Par la suite, les expériences basées sur l'homologie de la voie de transduction entre *A. thaliana* et *P. ramosa* ont permis de mettre en évidence divers acteurs de la voie des SL au cours de la germination. En effet, les résultats obtenus quant aux récepteurs putatifs confirment ceux obtenus précédemment chez *A. thaliana* mais également chez les plantes parasites. L'hypothèse proposant que les gènes *KAI2* codent les récepteurs aux SL (Nelson WCPP2012, Sheffield, UK) impliqués dans l'étape de germination des plantes parasites se voit donc confortée. D'autre part, nous avons démontré le rôle majeur du protéasome 26S dans la voie de transduction du signal SL menant à l'induction de *PrCYP707A1*, et son implication dans le processus de germination des plantes parasites. On peut alors émettre l'hypothèse que la voie de transduction des SL aboutit à la dégradation d'un répresseur qui inhiberait de manière directe ou indirecte l'expression du gène *PrCYP707A1*.

Chapitre IV

La modulation du taux de méthylation des cytosines de l'ADN module la germination des graines de la plante parasite obligatoire *Phelipanche ramosa*

Introduction

La germination des graines des plantes parasites requiert l'induction par un stimulant de germination d'un gène *CYP707A*, qui permet de cataboliser l'ABA et entraine la levée de dormance. Néanmoins, chez les plantes parasites, l'induction de ce gène en réponse aux stimulants de germination n'est possible qu'après la période de conditionnement, période d'une durée variable en fonction de l'espèce et sous contrôle abiotique. Le conditionnement permet alors un changement d'état physiologique, de graines non conditionnées insensibles, à des graines conditionnées sensibles aux stimulants de germination. Bien que des paramètres nécessaires au conditionnement soient connus depuis longtemps, les processus biologiques et physiologiques sous-jacents sont à ce jour peu connus.

Nous avons démontré que le conditionnement des graines de *P. ramosa* s'effectue en quatre jours (21°C, obscurité, Lechat et *al.*, 2012). L'imbibition et la conversion de la charge énergétique (de l'AMP vers ATP+ADP) des graines sont observées dès le premier jour. Les gènes codants les récepteurs putatifs aux stimulants de germination sont également exprimés dès le premier jour et atteignent leur maximum d'expression au cours du troisième jour de conditionnement (Chapitre II, partie 2). Ces évènements, bien que nécessaires, ne sont donc pas responsables de l'inaptitude des graines à germer en réponse au GR24 chez les graines à l'état non conditionné. Ces résultats suggèrent donc l'existence d'autres mécanismes contrôlant le conditionnement, et donc l'inductibilité du gène *PrCYP707A1* par les stimulants de germination.

Dans ce chapitre, l'implication de deux facteurs, l'ABA et le taux de méthylation de l'ADN, connus pour être impliqués dans la germination des graines de plantes non parasites, ont été explorés. Dans un premier temps, l'étude présente l'impact de l'ABA sur le conditionnement, et de l'expression du gène *PrCYP707A1*. Dans un second temps, l'implication d'un processus épigénétique, la déméthylation des cytosines de l'ADN, au cours du conditionnement est étudiée.

2- Article soumis:

DNA methylation modulates seed germination in response to strigolactone in the obligate root parasitic plant, *Phelipanche ramosa* L. Pomel

DNA methylation modulates seed germination in response to strigolactone in the obligate root parasitic plant, *Phelipanche ramosa* L. Pomel

Marc-Marie Lechat*, Guillaume Brun*, Séverine Thoiron, Jean-Bernard Pouvreau, Grégory Montiel, Christophe Véronési, Philippe Simier and Philippe Delavault

Laboratoire de Biologie et Pathologie Végétales, SFR 4207 QUASAV, Université de Nantes, 2 rue de la Houssinière, BP 92208, 44322 Nantes Cedex 3, France

* These *authors contributed* equally to this work

Authors for correspondence:
Philippe Delavault
Tel: +33 2 51 12 56 17
Email: philippe.delavault@univ-nantes.fr

Article: 6270
Introduction: 950
Materials and methods: 1625
Results: 1617
Discussion: 2078
Figures: 6
Table: 1

Summary

- Seed dormancy release of the obligate root parasitic plant, *Phelipanche ramosa*, requires a minimum four day conditioning period followed by a stimulation by chemical stimuli, the germination stimulants (GS). Germination is then mediated by a GS-dependent activation of *PrCYP707A1*, an abscisic acid (ABA) catabolic gene. The molecular mechanisms occurring during the conditioning period that silence *PrCYP707A1* expression and regulate GS response, however, are almost unknown.
- Global DNA methylation quantification associated with pharmacological approaches and cytosine methylation analysis of *PrCYP707A1* promoter were employed to investigate the modulation and the possible role of DNA methylation during the conditioning period and in the *PrCYP707A1* response to GR24, a strigolactone analogue.
- An active global DNA demethylation occurs during the conditioning period and is required for *PrCYP707A1* activation by GR24 and for subsequent seed germination. A treatment with 5-azacytidine or hydroxyurea, DNA hypomethylating or hypermethylating molecules, reduces the length of the conditioning period or inhibits seed germination, respectively. DNA demethylation particularly impacts a 78 bp sequence in the *PrCYP707A1* promoter.
- Our results demonstrate that the DNA methylation status during conditioning period plays a crucial role in regulating *P. ramosa* seed germination by controlling the strigolactone-dependent expression of *PrCYP707A1*.

Key words: bisulfite sequencing, branched broomrape (*Phelipanche ramosa*), DNA methylation, dormancy release, epigenetic regulation, parasitic plant, seed germination, strigolactone.

Introduction

Some parasitic plants are proved to be deadly pests with the capacity to exploit other plants. Among the obligate root parasitic weeds, the holoparasites which are devoid of chlorophyll and thus unable to carry out photosynthesis totally rely on a host for their water, mineral and carbohydrate supplies. Members of the genus *Orobanche* and *Phelipanche*, belonging to the *Orobanchaceae* family, are thus the final result of this evolutionary transition from autotrophism to heterotrophism (Westwood *et al.*, 2010). The underlying process of this trophic exploitation, governed by a fine-tuned molecular dialogue between both partners, is an extraordinary example of adaptive plant biology operated by these parasitic organisms in the course of evolution. Among the remarkable morphological and physiological adaptations that characterized this transition, the requirement for the seeds to perceive molecules produced by host roots to germinate is probably the most intriguing one. Indeed, the germination of broomrape species is a two-step process corresponding first to a conditioning period, thought to be required for the acquisition of the sensibility to the germination stimulants (Joel *et al.*, 1991; 1995), followed by the chemical stimulation of the germination itself that ends with the radicle protrusion (Lechat *et al.*, 2012).

During the conditioning period, broomrape seeds are exposed to a moist environment and suitable temperatures and it is suggested that this corresponds to physiological processes resulting in the set-up of the machinery needed for germination stimulant perception. In *P. ramosa*, it has been shown that seeds require a minimum of 4 days of conditioning at 21°C to allow optimal germination in response to germination stimulants (Lechat *et al.*, 2012). The conditioning period starts with a water entry in the seed through the micropyle that opens after 30 min (Joel *et al.*, 2012) and results in seed imbibition that takes around 1h. Then several physiological processes occur indicating a rapid metabolic reactivation. First, an optimal Adenylate Energy Charge is reached as of first day of conditioning (Lechat *et al.*, 2012). A strong decrease in ABA seed content occurs during the same period of conditioning in *P. ramosa* (Lechat *et al.*, 2012) along with a high release in the medium in the case of *O. minor* (Chae *et al.*, 2004). A characteristic pattern of respiration, protein synthesis, and utilization of reducing sugars (Bar-Nun & Mayer, 1993; 2002) occur as well as a strong alternative oxidase activity (Bar-Nun *et al.*, 2003). Uematsu *et al.* (2007) have also demonstrated that an accumulation of cAMP associated to a gibberellin synthesis occurs in *O. minor* seeds while a decrease of cAMP quantity was observed in *P. ramosa* (data not shown). Although the exact underlying mechanisms are not yet known, all these events are potentially involved in the set-

up of the mechanisms needed for stimulant perception or signal transduction and therefore for broomrape seed germination. Following this conditioning period, seeds of broomrape species are still unable to germinate without the stimulation by a chemical compound produced and exuded in the rhizosphere by surrounding host roots. Although the key role of germination stimulants has been known for several decades, almost nothing was known about the early molecular events governing the germination of root parasitic plants in response to stimulants. Recently, using a transcriptomic approach, Lechat *et al*. (2012) highlighted the major role of *PrCYP707A1*, an abscisic acid (ABA) catabolic gene, in the germination of *P. ramosa* seeds in response to the strigolactone (SL) analogue GR24. GR24 application after conditioning period triggered a rapid and strong up-regulation of *PrCYP707A1* during the first 18 h, followed by an 8-fold decrease in ABA levels detectable 3 days after treatment. GR24 treatment of conditioned seeds together with exogenous treatment with ABA, or Abz-E2B, a specific inhibitor of CYP707A, caused inhibition of germination (Lechat *et al.*, 2012; Pouvreau *et al.*, 2013). These results demonstrated that germination occurs after a dormancy release of the seeds triggered by ABA catabolism mediated by the GR24-dependent activation of *PrCYP707A1* gene. Interestingly, *PrCYP707A1* expression is not triggered by GR24 during the first 4 days of the conditioning period suggesting the occurrence of a repressive mechanism that should be overcome to allow seed germination. Therefore, the conditioning period can be defined as the minimal period required for *P. ramosa* seeds to gain the ability to germinate in response to SL which can be monitored through the induction of *PrCYP707A1* expression.

During their plants life cycles, it has been shown that plants respond to environmental cues by epigenetic mechanisms including the modification of DNA methylation status (Richards, 1997). Promoters or coding regions of silent genes are for instance found to be more methylated than actively transcribed sequences (Finnegan *et al.*, 1993) and it is admitted that DNA methylation can regulate gene expression (Martienssen & Colot, 2001; Chan *et al.*, 2005). While DNA methylation only affects the symmetrical CG sequences in mammals by conversion from cytosine to 5-methylcytosine (Bird, 2002) in plants CG, CHG, CNG and CHH motifs are concerned (Gruenbaum *et al.*, 1981; Vanyushin, 2006). In plant, cytosine methylation thus plays essential roles in plant regulation of gene expression in a developmental stage-dependent or tissue-specific manner (Chan *et al.*, 2005; Gehring & Henikoff, 2007), and many recent studies have also reported such a phenomenon during seed development (Kapazoglou *et al.*, 2012). Moreover, it has been reported that the dormancy release and germination process is correlated with cytosine demethylation in rapeseed (Lu *et al.*, 2006), pepper (Portis *et al.*, 2004) and wheat (Meng *et al.*, 2012).

In this present study, we investigated the role of DNA methylation modulation during the conditioning period of *P. ramosa* seeds and demonstrated that a cytosine demethylation was involved in the seed germination of this parasitic plant by controlling the *PrCYP707A1* response to GR24, a strigolactone analogue.

Materials and Methods

Plant material

P. ramosa (L.) Pomel seeds were collected from mature flowering spikes on broomrape parasitizing oilseed rape field (*Brassica napus*) at Saint-Jean-d'Angély (France) in 2012, and were stored at 25 °C in darkness until use. Seeds were surface-sterilized according to Lechat *et al.* (2012): 5 min in sodium hypochlorite (12%), and thoroughly rinsed three times for 1 min and three times for 5 min with sterile distilled water. Seeds were then suspended in conditioning medium (CM, 1 mM Na/K phosphate buffer; pH7.5, adjusted with KOH) and 0.1% PPM (Plant Preservative Mixture, Kalys, Bernin, France), with a ratio of 10 mg seeds ml^{-1} for germination assay or 40 seeds mg mL^{-1} for sample preparation. Seeds were then placed in the dark at 21 °C during the conditioning period.

Germination assay

Sterilized seeds were conditioned from 0 to 7 days in a 96-well plate (Cell Culture Multiwell Plate Cellstar; Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany) according to Pouvreau *et al.* (2013) in CM or in CM supplemented with 250 µM 5-azacytidine, a hypomethylating agent (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) or with 250 µM hydroxyurea, a hypermethylating agent (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) or with 250 µM ABA, in a final volume of 100 µL per well. After the different conditioning periods, at 21°C in the dark, 1 nM GR24 (0.1% acetone, v/v) was added. A 0.1% acetone (v/v) CM was used as a negative control. Subsequently, plates were incubated for 3 d at 21 °C in the dark, and germination percentages were determined as previously described in Pouvreau *et al.* (2013). Seeds were considered as germinated when the radicle protruded out of the seed coat and when they were colored by methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (MTT). Each germination assay was repeated at least six times. For seed viability tests following the addition of hydroxyurea or ABA, treated seeds were washed three times with 100 µl of 1 mM Na/K phosphate buffer (pH 7.5) after an initial count without MTT. Then, 100 µl of 1 nM GR24 in 0.1% acetone were applied to the washed seeds. Plates were incubated as mentioned above prior to the determination of germination percentage.

Sample preparation

For molecular analyzes, gene expression and DNA methylation, 5 mL of sterilized *P. ramosa* seeds (200 mg) were conditioned in tissue culture flasks (Becton Dickinson, New Jersey, USA) in CM, or in CM supplemented with 1 mM 5-azacytidine or 1 mM hydroxyurea, or 1 mM ABA, in the dark at 21°C. Seeds were collected each day during 7 days by filtration on 100 µm nylon mesh, blotted on absorbent paper, then frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C before subsequent nucleic acid purification. To determine *PrCYP707A1* expression, seeds were stimulated with 1 nM GR24 during 6 h before being collected. For all experiments, a fresh aliquot was conserved to evaluate the germination rate after chemical treatment, according to the protocol established by Pouvreau *et al.* (2013).

DNA and RNA extraction

Total DNA were isolated from 200 mg of treated seeds using Nucleospin Plant II (Macherey Nagel, Hoerdt, France) according to manufacturer's instructions. DNA was quantified spectrophotometrically (A_{260}/A_{280}; NanoDrop Spectrophotometer ND-1000, Labtech International Ltd, Rigmer, UK), and stored at -20 °C before use.

Total RNA were isolated from 200 mg of 6 h GR24-treated seeds, using the Nucleospin RNA Plant kit (Macherey Nagel, Hoerdt, France) according to manufacturer's instructions, with specific lysis buffer guanidinium-HCl (RAP buffer). RNA extracts were then treated with 6.8 Kunitz units of RNase-Free DNase I (Qiagen, Courtaboeuf, France), cleaned, and concentrated with RNA clean up XS kit (Macherey Nagel, Hoerdt, France). The integrity of total RNA was checked by electrophoresis on a 2% (w/v) agarose gel and RNA extracts were quantified spectrophotometrically (A_{260}/A_{280}; NanoDrop Spectrophotometer ND-1000, Labtech International Ltd, Rigmer, UK).

Real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

cDNA was synthesized from 0.5 µg of total RNA using the Superscript II Reverse Transcriptase (Invitrogen) following the manufacturer's instructions. RT-PCR experiments using SYBR Green technology were carried out on an Applied Biosystems 7300 real-time PCR system (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) according to Lechat *et al.* (2012). Specificity of the PCR amplification was checked using a heat dissociation protocol (from 60 to 95 °C) after the final cycle of PCR. Fold change in RNA expression was estimated using threshold cycles. The amplicon of the constitutive elongation factor *PrEF1α* (Table 1), which showed

low cycle threshold (Ct) variation (standard deviation <0.5 Ct), was used as an internal control to normalize all the data (Péron *et al.*, 2012). The gene-specific primers used for each amplification are presented in the Table 1. A control experiment without cDNA was included for each PCR mix. Three biological replicates were performed each in three technical replicates. An analysis of variance was performed on the results from RT-PCR analyses using SigmaPlot version 10.0. Means of three independent RNA isolations were tested at $P < 0.05$ (Tukey test).

Determination of PrCYP707A1 promoter sequence

Sequence of *PrCYP707A1* promoter was obtained by using the Genome Walker Universal Kit (Clontech, Palo Alto, CA, USA) according to manufacturer's instructions. The promoter was amplified by a single PCR reaction using specific adaptor primers AP1 and a gene specific primer GWPrCYP707A1 (Table 1). A single PCR products was cloned using the pGEM®-T Easy Vector Systems Kit (Promega, Madison, WI, USA) according to manufacturer's instructions and sequenced (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Germany). A *PrCYP707A1* promoter sequence of 2581bp was obtained and assembled with the *PrCYP707A1* gene sequence (GenBank accession number: KM226163).

Global DNA methylation quantification

Global DNA methylation quantification was conducted using a MethylFlash Methylated DNA Quantification kit according to manufacturer's instructions (Epigentek Inc., Farmingdale, NY). Three biological replicates with three technical repetitions were done. 100 ng of DNA was bound to strip wells that were specifically treated to have a high DNA affinity. The methylated fraction of DNA was detected using capture and detection antibodies and then quantified colorimetrically by reading the absorbance in a microplate spectrophotometer at 450 nm. The amount of methylated DNA was proportional to the OD intensity. The absolute amount of methylated DNA was quantified from a standard curve. Quantity and percentage of methylated DNA (5-mC) in total DNA were calculated using the below formulas

$$5-\mathrm{mC}\ (\mathrm{ng}) = \frac{\text{Sample OD} - \text{ME3 OD}}{\text{Slope x 2}}$$

$$5-\mathrm{mC}\ (\%) = \frac{5-\mathrm{mC}\ (\mathrm{ng})}{\mathrm{S}}\ \mathrm{x}\ 100$$

S is the amount of input sample DNA in ng. ME3 is the negative control. Slope of the standard curve was obtained after linear regression.

Methylation analysis of PrCYP707A1 promoter

PrCYP707A1 promoter sequence was investigated with MethPrimer software (http://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi) to determine the presence of CpG islands using the following identification parameters: Island size > 100 bp, GC% > 50, and Obs/Exp > 0.6. Methylation levels of the *PrCYP707A1* promoter during conditioning period was quantified using MeDIP-PCR kit according to manufacturer's instructions (ActiveMotif Europe, La Hulpe, Belgium). Prior to MeDIP, 5 µg DNA of three biological replicates for each timepoint were fragmented using a sonicator Sonifier® S-450A (Brandon Ultrasonics Corporation, Danbury, CO, USA) following 15 cycles of 40 pulses (30% amplitude) into fragment of ± 500 bp in length. 500 ng fragmented DNA were used for each MeDIP assay. Using Primer Express 3 software, three primers sets were designed for each CpG island: MeDIP -679/-570, MeDIP -549/-478, and MeDIP -529/-447 for CPG island 1 and MeDIP -2117/-2010, MeDIP -2027/-1831, and MeDIP -1851/-1753 for CpG island 2 (Table 1).

Restriction analysis and methyl-sensitive PCR semi-quantitative amplification

Methyl-sensitive PCR (MS-PCR) was performed using a methyl sensitive restriction enzyme. Three replicates of 500 ng of genomic DNA, extracted from seeds conditioned for 0 (D0) and 7 (D7) days, were digested by 5 U of *McrBC* (New England BioLabs, Ipswich, UK) during 2 h at 37°C. *McrBC* recognizes DNA containing two methylated cytosine residues (A/G 5-mC) separated by 40–2000 bp and cleaves the DNA at multiple sites close to one of the methylated sites. Digested and undigested genomic DNA was analyzed by electrophoresis on a 1% agarose gel, purified using Nucleospin Plant II (Macherey Nagel, Hoerdt, France), and quantified spectrophotometrically (A260/280 ; 260/230 ; NanoDrop Spectrophotometer ND-1000, Labtech International Ltd, Rigmer, UK). 1 ng of digested or undigested DNA was amplified by PCR using specific primers (Bisulfite -2181/-1728; McrBC -2130/-1830 and MeDIP -1851/-1753, see Table 1) and Q5 high fidelity polymerase (New England BioLabs, Ipswich, UK). After denaturation at 98°C for 30 s, amplification consisted in 30-40 cycles of 10 s at 98°C, 30 s at 55°C, and 20 s at 72°C. The number of PCR cycles was adjusted to avoid a saturation of amplification. PCR products were analyzed by electrophoresis on 1% agarose gel.

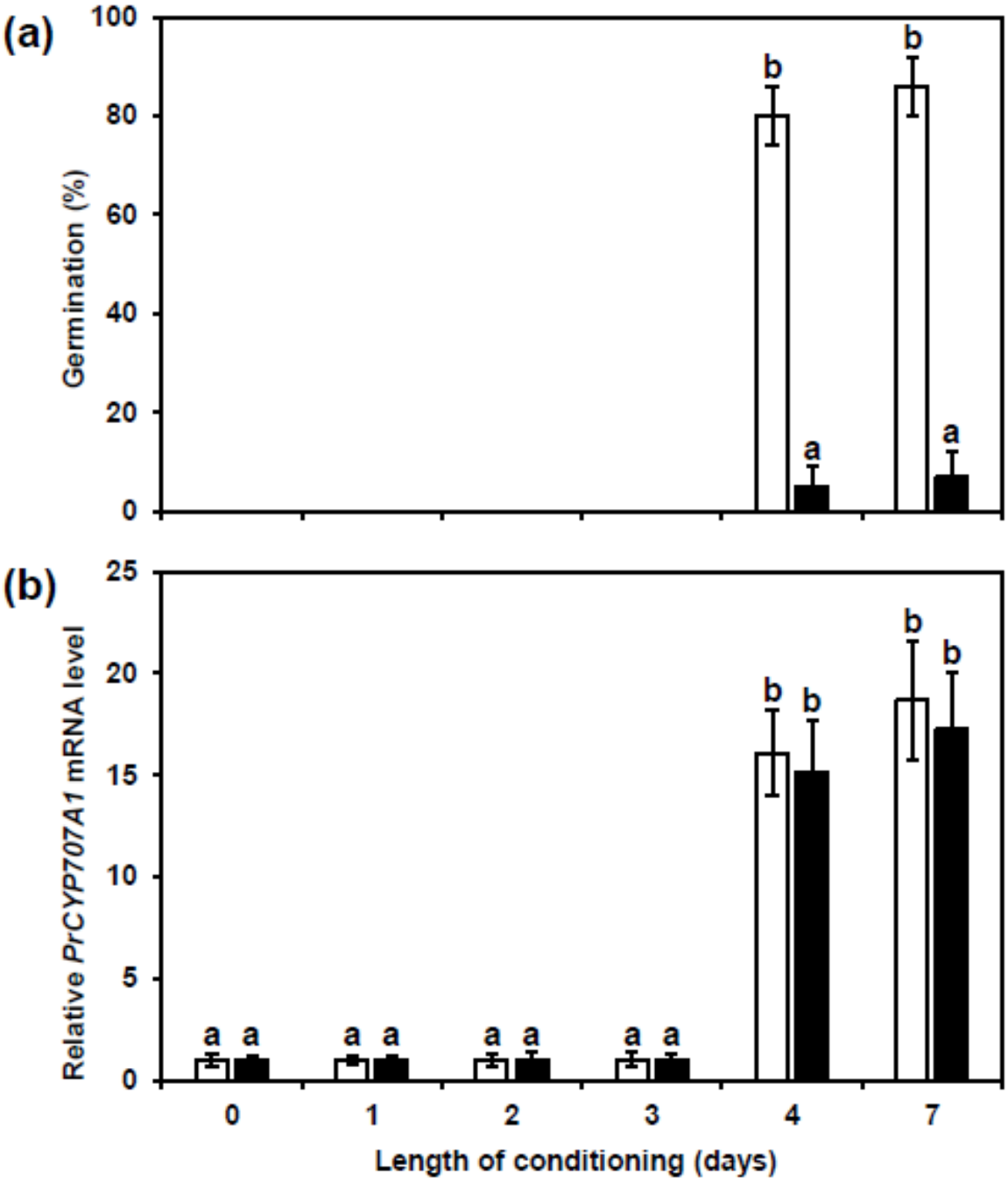


Fig. 4.1 The conditioning period is not controlled by ABA.

(a) Germination rate of *P. ramosa* seeds conditioned in CM supplemented (black bars) or not (white bars) with 250 µM ABA. After different length of conditioning, seeds were stimulated by 1 nM GR24 treatmen and germination rates were determined 3 d after. Means are values ± SD (n=6). (b) RT-PCR analysis of the expression of *PrCYP707A1* in seeds conditioned for different lengths of conditioning in CM supplemented (black bars) or not (white bars) with 1 mM ABA. After conditioning, seeds were stimulated by 1 nM GR24 and expression levels were determined 6 h after. Means are values ± SD (n=3). Means with the same letter are not significantly different from each other (Tukey test, $P < 0.05$). CM: conditioning medium.

Bisulfite sequencing

DNA methylation status at the nucleotide level of the *PrCYP707A1* 5'-upstream region was investigated using bisulfite sequencing. Because bisulfite treatment converts unmethylated cytosines to uracils, it was used to determine the methylation status of cytosines in CG, CHG and CHH contexts (With H could be A, T or C). Total DNA, extracted from seeds conditioned in CM for 0 (D0) and 7 (D7) days, were treated with bisulfite using the Zymo Research EZ DNA Methylation-Gold Kit (Irvine, CA, USA). 600 ng DNA of three biological replicates for each condition were converted using the most efficient conditions described in literature: 95°C for 4 min and 47°C for 1.5h (Kiselev *et al.*, 2013). A primer set, Bisulfite -2181/-1728 (Table 1), was designed by Methyl Primer Express v1.0 Software to amplify the whole CpG island 1 localized between -2183 and -1708 bp upstream of the transcription start site (-73 bp from ATG). PCR products were cloned using the pGEM®-T Easy Vector Systems Kit (Promega, Madison, WI, USA) and a total of 20 clones per condition were sequenced (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Germany). According to Trap-Gentil et *al*. (2011), when >50% of clones still exhibit a cytosine in any position, it was considered as hypermethylated.

Results

ABA does not influence the expression of the GR24 responsive gene PrCYP707A1

Seeds were conditioned into CM supplemented or not with ABA for different lengths of time, and germination rate, *PrCYP707A1* expression, and minimal conditioning time were investigated. The expected minimum conditioning period of 4 days in CM was observed (Fig. 1a) as already reported by Lechat *et al.* (2012). However, when incubated in CM supplemented with 250 µM ABA and then treated with 1 nM GR24, seeds did not germinate after 4 or 7 days of conditioning (5 ± 2% and 7 ± 5%), in opposite to seeds incubated in ABA-free CM (74 ± 6% and 86 ± 6%) (Fig. 1a). To determine whether ABA control or not the length of the conditioning period, seeds conditioned for 7 days in 250 µM of ABA were washed and then subsequently stimulated with 1 nM GR24. In those conditions, seeds did germinate at 77 ± 5.9% 3 days after stimulation, which is not statistically different from germination rates obtained when seeds were incubated in ABA-free CM (ANOVA, data not shown). It seems thus that application of ABA only during the conditioning period cannot prevent germination. In parallel, *PrCYP707A1* expression was evaluated in seeds conditioned or not in 1 mM ABA and then treated for 6 h with GR24 1 nM (Fig. 1b) without removing ABA. In these conditions seed germination was

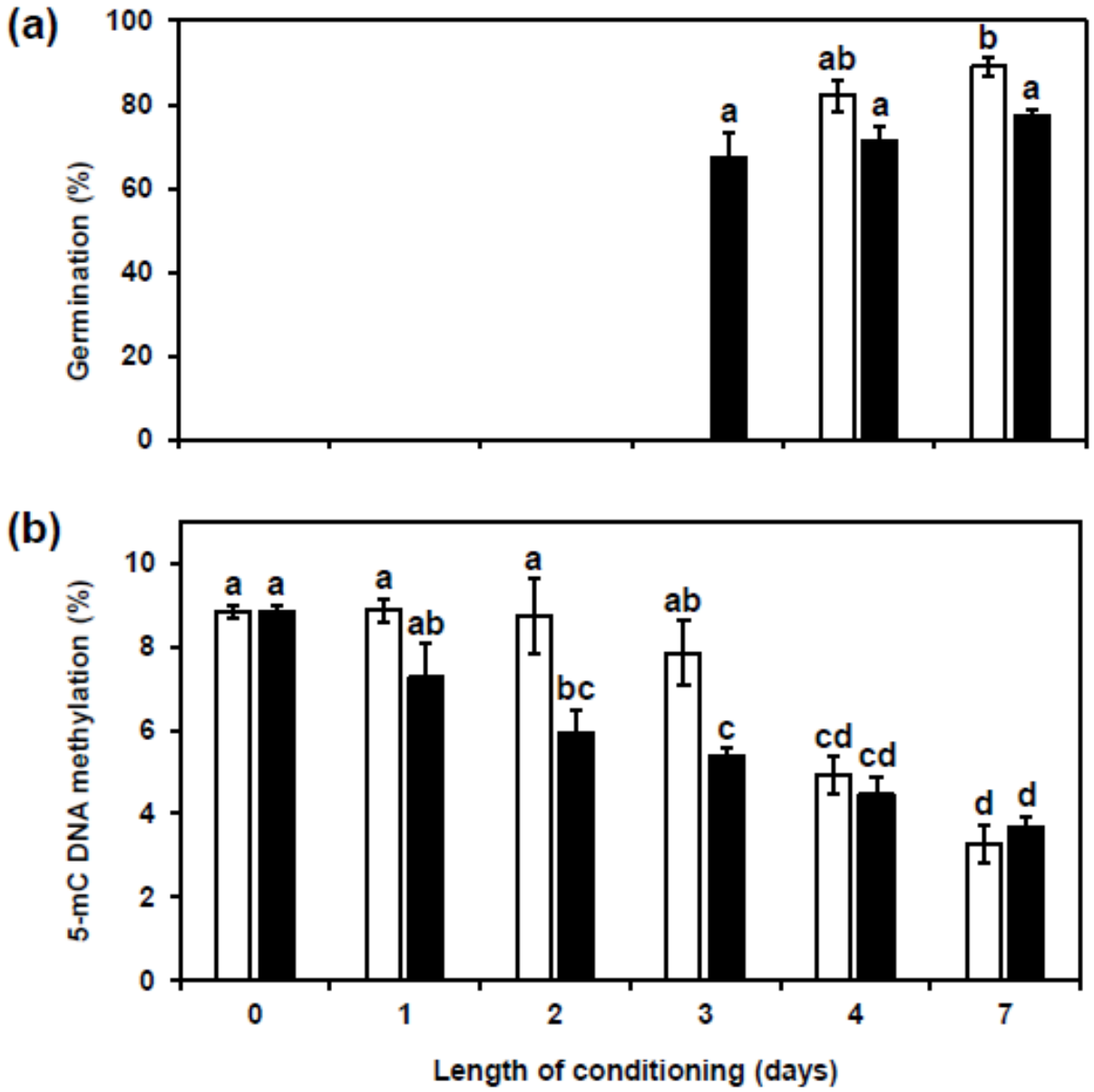


Fig. 4.2 A global DNA demethylation occurs during the conditioning period.

(a) Germination rate of *P. ramosa* seeds conditioned in CM supplemented (black bars) or not (white bars) with 250 µM 5-azacytidine. After different length of conditioning, seeds were stimulated by 1 nM GR24 treatment and germination rates were determined 3 d after. Means are values ± SD (n=6). (b) % of 5-methylcytosine in seeds conditioned for different lengths of conditioning in CM supplemented (black bars) or not (white bars) with 250 µM 5-azacytidine. Means are values ± SD (n=3). Means with the same letter are not significantly different from each other (Tukey test, $P < 0.05$). CM: conditioning medium.

inhibited, but this did not affect the up-regulation of *PrCYP707A1* (15.1 ± 2.3 at day 4) in response to GR24 after the minimal conditioning time. The observed *PrCYP707A1* transcript accumulation was moreover similar to that observed in seeds conditioned in ABA-free CM (16.08 ± 2.13).

Altogether, these results demonstrated that although exogenous ABA treatment unambiguously inhibited germination in response to SL, it does not control the minimal conditioning period since the up-regulation of *PrCYP707A1* still occurred in response to chemical stimulation.Therefore, although ABA is an inhibiting factor for seed germination, it does not influence the capacity of seeds to respond to germination stimulants.

A Global DNA demethylation during the conditioning period is required for PrCYP707A1 expression and seed germination in response to GR24

The evolution of the global DNA methylation level in the seeds during conditioning period was estimated and compared to the germination kinetic in response to GR24 (Fig. 2). When seeds were conditioned in CM, the minimum period required for the seeds to germinate in response to GR24 was as expected 4 days (82 ± 7%) (Fig. 2a). In these conditions, DNA methylation level remained stable (8.8 ± 0.1%) during the first two days of conditioning and then significantly decreased from the third day (7.8 ± 0.7%) to be finally reduced by nearly half on the fourth day (4.9 ± 0.5%) when seeds have gained the ability to germinate in response to GR24 (Fig. 2b). Then, DNA methylation level remained stable at a low value (3.3 ± 0.8%) during the following days.

In order to determine if the observed DNA demethylation process, occurring in *P. ramosa* during conditioning, has a key role in the acquisition of the ability to germinate in response to GR24, seeds were treated with 250 µM 5-azacytidine, a hypomethylating agent. In these conditions, the minimum conditioning period required to obtain the optimal germination was reduced to 3 days (67 ± 6%) instead of 4 days in control conditions (82 ± 7%) (Fig. 2a). A longer conditioning period in 5-azacytidine did not affect significantly the maximum germination rate (Fig. 2a). In the meantime, the evolution of the methylation status during the conditioning period was determined and compared between control and 5-azacytidine conditions (Fig. 2b). In comparison with untreated seeds, the DNA methylation level in seeds treated with 5-azacytidine decreased continuously and regularly from 8.8 ± 0.2% on day 1 just after imbibition to 5.3 ± 0.12% on day 3 when germination can be triggered by GR24 treatment. DNA methylation level finally reached 3.6 ± 0.3% which was similar to the level observed in untreated seeds after 7 days.

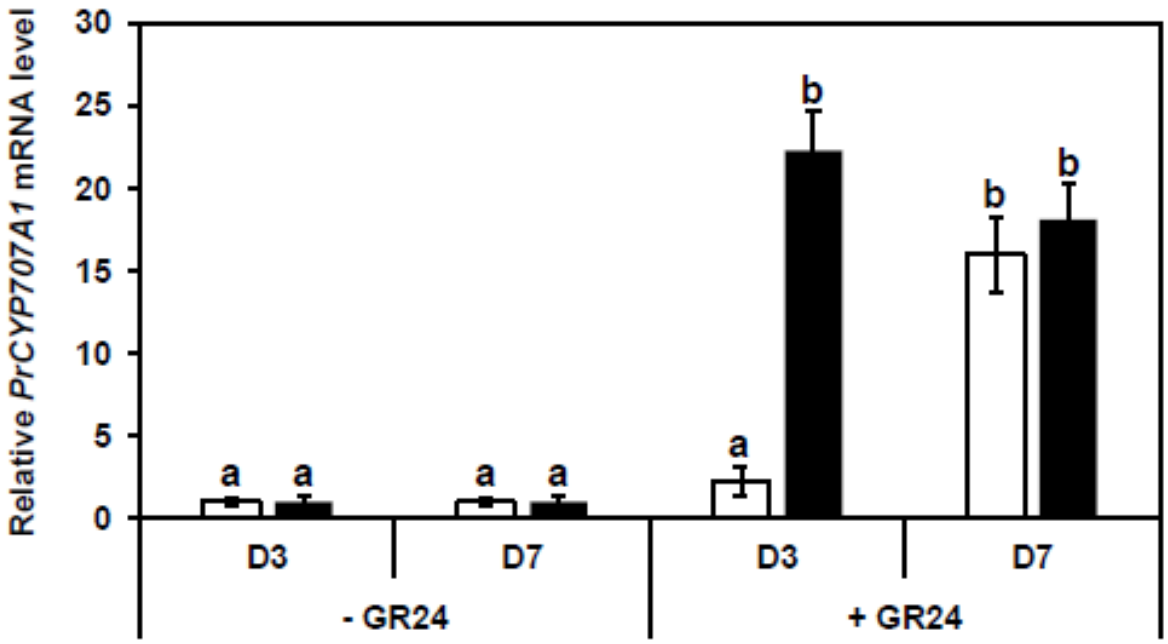


Fig. 4.3 Global DNA methylation controls *PrCYP707A1* expression.

RT-PCR analysis of the expression of *PrCYP707A1* in seeds conditioned 3 (D3) or 7 (D7) d in CM supplemented (black bars) or not (white bars) with 250 µM 5-azacytidine. After conditioning, seeds were stimulated (+ GR24) or not (- GR24) by 1 nM GR24 treatment and expression levels were determined 6 h after. Means are values ± SD (n=3). Means with the same letter are not significantly different from each other (Tukey test, $P < 0.05$). CM: conditioning medium.

Using real-time RT-PCR assays, expression level of *PrCYP707A1* was analyzed in seed conditioned 3 and 7 days in CM supplemented or not with 1 mM 5-azacytidine followed by a 6 h treatment with 1 nM GR24 (Fig. 3). After 3 days of conditioning in CM, GR24 treatment did neither trigger *PrCYP707A1* overexpression nor seed germination whereas after a 7 day conditioning period, GR24 induced the expression of *PrCYP707A1* and the subsequent seed germination. When seeds were conditioned in 5-azacytidine, GR24 treatment triggered an overexpression of *PrCYP707A1* (24.3 ± 2.3) after only 3 days of conditioning. Seeds conditioned in 5-azacytidine for 7 days displayed *PrCYP707A1* expression levels upon GR24 stimulation (18.1 ± 2.1) which are similar to those observed in untreated seeds (16.1 ± 2.3). Thus, sensitivity to GR24 as well as inducibility of *PrCYP707A1* occurred 3 or 4 days post imbibition depending if seeds where treated or not with 5-azacytidine respectively. Interestingly, at both timing, DNA methylation levels were statistically equivalent around 5.3 ± 0.2% and 4.9 ± 0.5% suggesting that a global DNA methylation level lesser than 5.5% was required for the seeds to be receptive to GR24, *PrCYP707A1* to be up-regulated, and then the seeds to germinate.

Global DNA hypermethylation inhibits PrCYP707A1 expression and seeds germination in response to GR24

To further investigate the requirement of a change in DNA methylation status prior to seed germination, the effect of hydroxyurea, a hypermathylating agent, was applied during seed germination (Fig. 4). While GR24-treated seeds conditioned for 7 days in CM showed a high germination rate (86 ± 4.2%), GR24-treated seeds incubated for 7 days in hydroxyurea exhibited a low germination rates (20 ± 2.7%). Seeds conditioned 7 days in CM then treated concomitantly with GR24 and hydroxyurea did not display any reduction in the optimum germination rate (81 ± 4.8%) which was statistically equivalent to that observed in GR24 only-treated seeds (Fig. 4a). Together, these data suggested that hydroxyurea did not affect the germination process itself but rather the completion of the conditioning period.

RT-PCR assays showed that *PrCYP707A1* gene expression in seeds conditioned 7 days in CM was strongly induced upon GR24 treatment (15 ± 2.1) (Fig. 4b). A concomitant treatment with GR24 and hydroxyurea did not induce any significant modification of this up-regulation. By contrast, when hydroxyurea was applied during conditioning, an almost 4-fold reduction in *PrCYP707A1* transcript levels was observed in comparison to untreated seeds. This reduction in *PrCYP707A1* gene expression came along with a low germination rate. Hydroxyurea treatments led to an absence of reduction of the DNA methylation level which remained stable

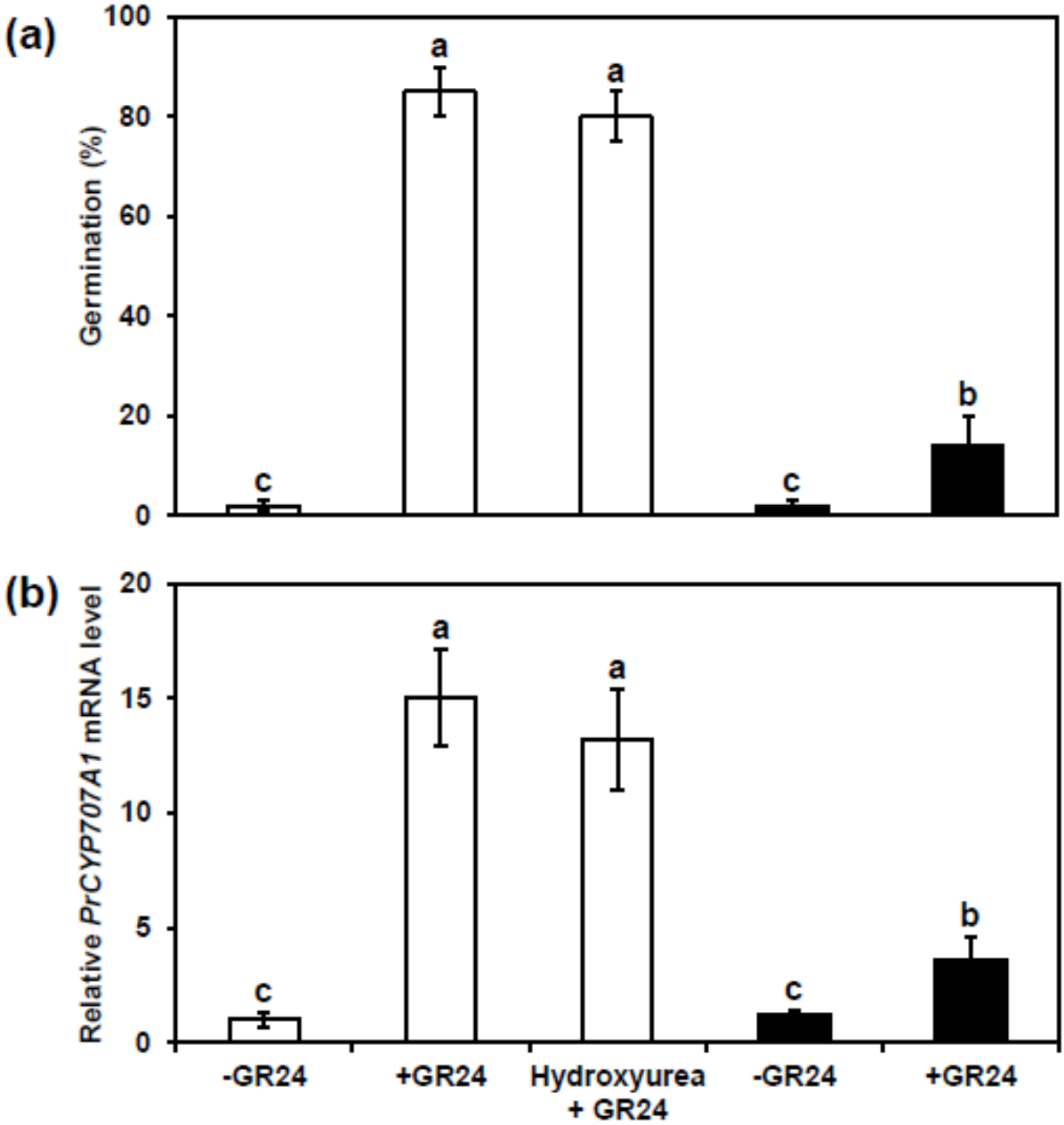


Fig. 4.4 The hypermethylating hydroxyurea applied during conditioning inhibits GR24-dependent up-regulation of *PrCYP707A1* and germination.

(a) Germination rate of *P. ramosa* seeds conditioned in CM supplemented (black bars) or not (white bars) with 250 µM hydroxyurea. After 7 days of conditioning, seeds were stimulated (+GR24) or not (-GR24) by 1 nM GR24 treatment and germination rates were determined 3 d after. Means are values ± SD (n=6). (b) RT-PCR analysis of the expression of *PrCYP707A1* in seeds conditioned 7 d in CM supplemented (black bars) or not (white bars) with 250 µM hydroxyurea. After conditioning, seeds were stimulated (+GR24) or not (-GR24) by 1 nM GR24 and expression levels were determined 6 h after. Means are values ± SD (n=3). Means with the same letter are not significantly different from each other (Tukey test, $P < 0.05$). CM: conditioning medium. Hydroxyurea + GR24 correspond to a treatment with both compounds after conditioning.

at 8.8 ± 0.3% throughout the conditioning period (data not shown). Hydroxyurea treatment was reversible and not lethal because after treatments, when seeds were washed and conditioned for a second 7 day period, a germination rate of 67 ± 7.9% could be observed (data not shown).

Thus, the hypermethylating treatment prevent the seeds to respond to GR24 and then to germinate by maintaining a DNA methylation level above the determined 5.5% threshold value. These results confirm that acquisition of GR24 responsiveness is under control of a DNA demethylation process.

The PrCYP707A1 *promoter displays a CpG island which is demethylated during conditioning*

In order to determine if the global DNA demethylation process observed during the conditioning period might also occur at the nucleotide level in the *PrCYP707A1* sequence, putative methylated sites were analyzed (Fig 5). Using *in silico* analyses, only two CpG islands were found at -2183/-1708 bp and -706/-406 bp from the transcription start site). The methylation rate of both CpG islands was evaluated using MeDIP-PCR at 0 (D0) and 7 (D7) days of conditioning period (Fig. 5b). The sequences of CpG island 1 and 2 were amplified using three primers sets covering 78% and 72% of the sequences, respectively (Fig. 5a). While the CpG island 1 exhibited no change in its methylation rate during the conditioning period, a significant demethylation was observed in CpG island 2. Indeed, in CpG island 2 the methylation rate of a region located between -1851 and -1753 was 36.9 ± 1.1% of input DNA at the beginning of conditioning (D0) and significantly decreased to reach 27.3 ± 0.6% after 7 days of conditioning (Fig. 5b).

To investigate more accurately this DNA demethylation process, we performed a bisulfite sequencing experiment (Fig. 6) in which a primer set was designed (Bisulfite -2183/-1728) to amplified most of the CpG island 2 following bisulfite treatment. After cloning and sequencing, we demonstrated that in this 475 nucleotide sequence, a 78 bp region (-1838/-1760) showed a statistically significant DNA demethylation (Fig. 6a) corroborating the result obtained by MeDIP-PCR (Fig. 5b) and thus confirming that the -1851 /-1753 region of the CpG island 2 was the main sequence impacted by the epigenetic mechanism. Indeed, this sequence (-1838/-1760) was hypermethylated at D0 (68.75% of 5mC) and hypomethylated at D7 (25% of 5mC), with CHH being the most affected motif, 63,6% methylated at D0 and 0% at D7. (Fig 6b).

Finally, all these results were confirmed by MS-PCR using *McrBC* restriction enzyme and three primer sets, one corresponding to the complete CpG island 2 (Bisulfite -2183/-1728) and two covering partially this island (McrBC -2130/-1830 and MeDIP-1851/-1753) (Fig. 6c). The amplification of the McrBC -2130/-1830 sequence was not affected by *McrBC* restriction

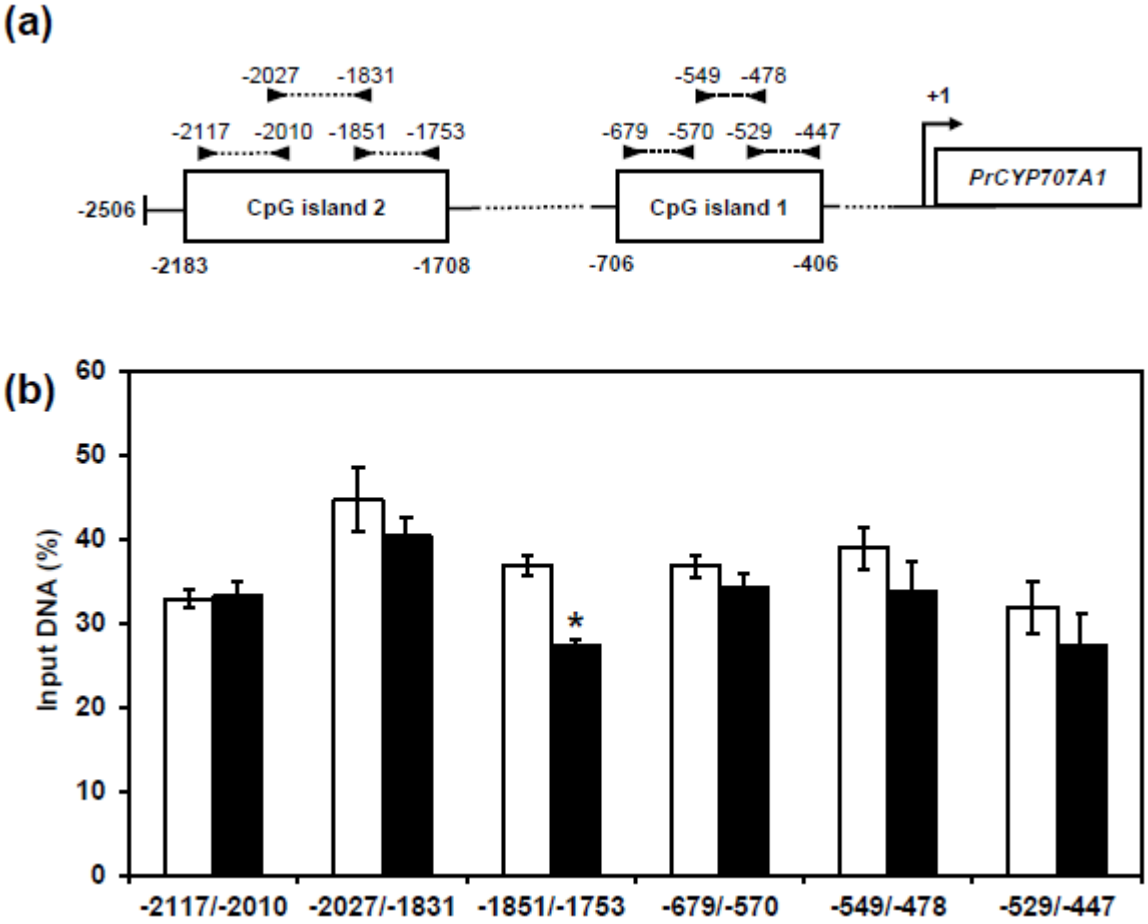


Fig. 4.5 DNA demethylation occurs in the promoter of *PrCYP707A1*.

(a) Localization of CpG islands and primers sets (black arrow) used in MeDIP-PCR on the *PrCYP707A1* promoter. Values correspond to island and primer positions in relation to the +1 transcription start site. (b) Methylation status of CpG islands on *PrCYP707A1* promoter assayed by MeDIP-PCR. Expression values after 0 (white bars) or 7 (black bars) d of conditioning were normalized with non-immunoprecipited DNA. Values are percentages of immunoprecipited DNA compared to initial DNA quantity used in the immunoprecipitation assay (Input DNA %). Values are means ± SD (n=3). An asterisk indicates a significant methylation difference between 0 and 7 d of conditioning (SNK test, $P < 0.05$).

whereas the Bisulfite -2183/-1728 and MeDIP -1851/-1753 sequences showed a strongest amplification at D7 suggesting that the shared -1851/-1753 sequence was less methylated at D7 than at D0. These results confirmed the hypomethylation of the -1838/-1760 region determined by MeDIP-PCR and bisulfite sequencing approaches.

Taken together, these results demonstrate that a 78 bp region of the CpG island 2 localized in the *PrCYP707A1* promoter undergoes a DNA demethylation process during the conditioning period.

Discussion

Seed germination of obligate root parasitic plants from the *Orobanchaceae* family, including species of *Orobanche*, *Phelipanche* or *Striga* genus, requires a stimulation by a host-derived signal called germination stimulants (Xie *et al.*, 2010). In 2012 it has been demonstrated that germination of *Phelipanche ramosa* seeds was SL-dependent, and that this chemical stimulation triggered a strong up-regulation of *PrCYP707A1*, an ABA catabolic gene (Lechat *et al.*, 2012). Moreover, it has been shown that the treatment with ABA or with Abz-E2B, a selective inhibitor of CYP707A enzymes (Okazaki *et al.*, 2012), could inhibit germination (Lechat *et al.*, 2012; Pouvreau *et al.*, 2013). These results emphasize the fact that ABA plays a prominent role in the control of *P.ramosa* germination after stimulation. Nevertheless, it has also interestingly been determined that *PrCYP707A1* expression, following imbibition, cannot be triggered by GR24 during a minimal 4 day period, indicating that seeds remain insensitive to the germination stimulant. It is therefore thought that acquisition of GS response occurs during this lag phase, called “conditioning period” (Matusova *et al.*, 2004), which would be similar to the stratification process of non-parasitic plants (Gubler *et al.*, 2005). Even if the existence of this lag phase cannot be denied, the molecular mechanisms governing its relief remained unknown. In general, seed dormancy and germination are known to be hormone-dependent (absissic acid and gibberellic acid mainly) and involve up-regulation or silencing of several associated genes (Finkelstein *et al.*, 2008). It has for instance been demonstrated that during conditioning periods of *O.minor* and *P.ramosa* seeds, a strong decrease of seed ABA contents naturally occurred, then followed by a second decrease attributed to a GS-induced PrCYP707A1 activity (Chae *et al.*, 2004; Lechat *et al.*, 2012). Altogether, these observations might suggest that during the conditioning period the acquisition of GS sensitivity, revealed by the *PrCYP707A1* up-regulation, could be controlled by endogenous ABA levels. However, this study showed that when ABA was supplied during conditioning, *PrCYP707A1* up-regulation

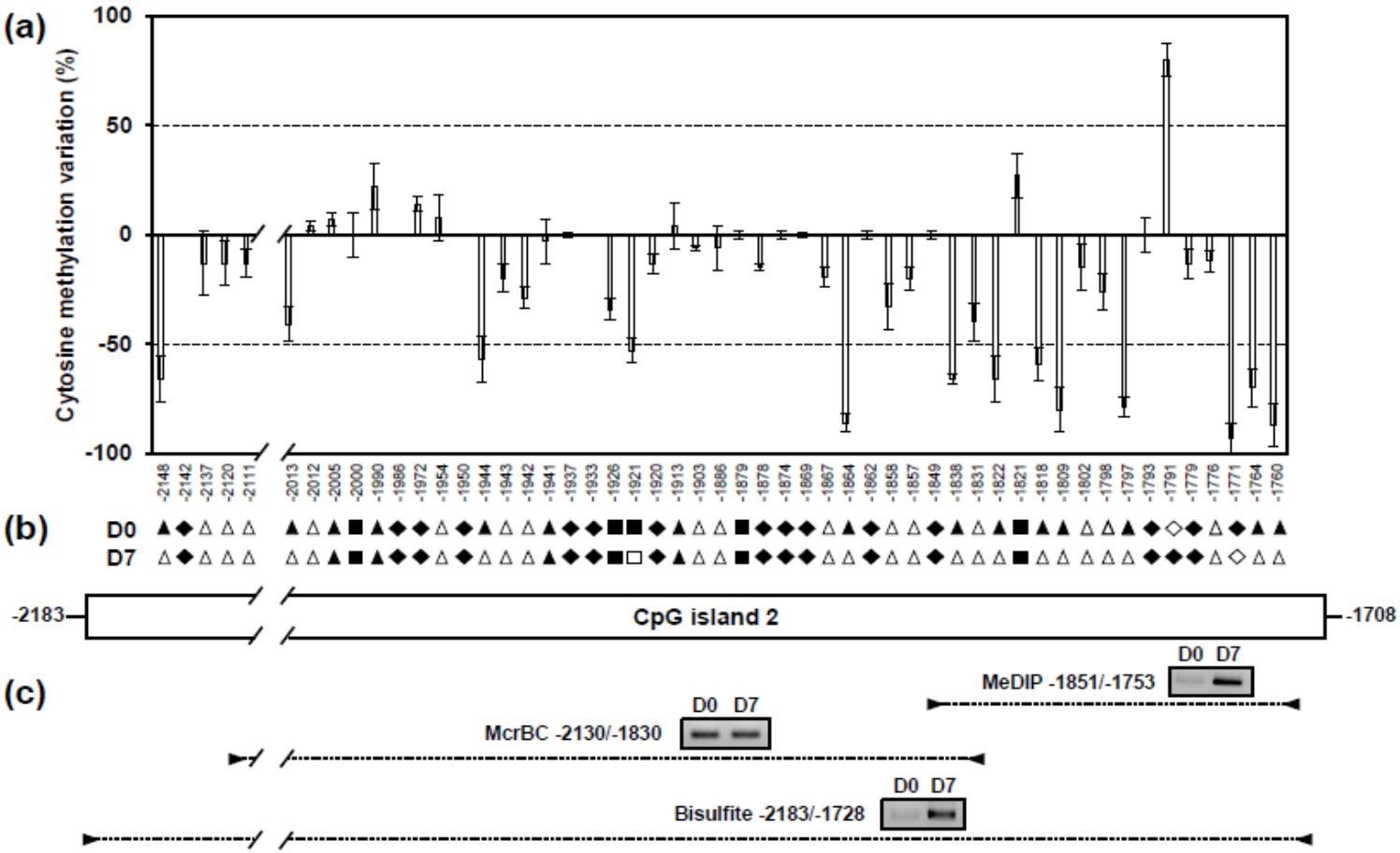


Fig. 4.6 DNA demethylation occurs in a 78 bp region of the *PrCYP707A1*promoter.

(a) Cytosine methylation variation of the CpG island 2 in the *PrCYP707A1* promoter during seed conditioning assayed by bisulfite sequencing. A positive value indicates a cytosine methylation process and a negative value a cytosine demethylation process. (b) Detailed methylation profiles for CpG island 2 at 0 (D0) and 7 (D7) d of conditioning. Potentially methylated sites CG, CHG, and asymmetric CHH (H=A, T, or C) are shown by diamonds, squares and triangles, respectively. According to their methylation percentage, cytosine sites are considered as hypermethylated (% of methylated cytosine > 50%, filled symbols), or hypomethylated (% of methylated cytosine < 50%, open symbols) (Trap-Gentil *et al.* (2011). (c) CG methylation status of CpG island 2 at 0 (D0) and 7 (D7) d of conditioning assayed by MS-PCR and three primer sets (black arrow). *McrBC* enzyme cuts in hypermethylated regions

was still triggered upon GR24 treatment. This indicate that the minimal period required for the seeds to perceive SL, referred as conditioning period, is not controlled by endogenous ABA content.

Recent studies suggest that some hormones-independent mechanisms may occur during the dormancy and germination processes (Nonogaki, 2014) and impact gene expression. These are mainly epigenetic mechanisms such as histone deacetylation and ubiquitination, and histone and DNA methylation (Hsieh & Fischer, 2005; van Zanten *et al.*, 2013). DNA methylation represents an important epigenetic mechanism known to influence chromatin structure and gene regulation, which modulation plays a major role in the regulation of plant development including seed germination in response to environmental conditions (Portis *et al.*, 2004). The distribution and the number of 5-methylcytosines (5mC) on DNA molecule is heritable but can also vary according to the developmental stage of the cell (Koukalova *et al.*, 2005). It has thus been demonstrated that during seed germination a global DNA demethylation process occurred, especially during seed imbibition in pepper, rapeseed or wheat (Portis *et al.*, 2004; Lu *et al.*, 2006; Meng *et al.*, 2012). Nevertheless, roles of this DNA demethylation within the germination process remain unclear.

In the present study, using a global DNA methylation quantification method, we demonstrated that during the conditioning period total DNA methylation level decreased in *P. ramosa* seeds but not in a continuous manner. Indeed, this decrease occurred between the third and fourth day, after which seed germination could be triggered by GR24. When demethylation was artificially generated by applying the hypomethylating 5-azacytidine during conditioning, the methylation levels similar to those obtained after 4 days in natural conditions were achieved only after 3 days. In the meantime, the up-regulation of *PrCYP707A1* expression was triggered following GR24 treatment after 3 or 4 days with or without demethylating compound respectively. Seeds ability to germinate therefore happened one day earlier when 5-azacytidine was used. Taken together, this suggests that seed germination could occur, after GR24-dependent *PrCYP707A1* activation, only when global DNA methylation has reached a sufficiently low level. In agreement with that, a DNA hypermethylating treatment during the conditioning phase maintained a high and constant DNA methylation level and also prevented *PrCYP707A1* induction by GR24 and the subsequent seed germination. Our results are therefore concordant with those obtained by Portis *et al.* (2004), Lu *et al.* (2006), and Meng *et al.* (2011) showing that, in pepper, rapeseed, and wheat respectively, methylation levels in dry seeds were higher than in tissues from germinating seeds. In *Silene latifolia*, a similar

demethylation process was also demonstrated during the first hour of water imbibition but affecting mainly the endosperm tissue (Zluvova *et al.*, 2001). Similarly, in *Arabidopsis* although *DML3* gene encodes a DEMETER-LIKE protein known to play a role in removing DNA methylation marks from improperly-methylated cytosines, this enzyme is also involved in the maintenance of high DNA methylation levels in properly targeted sites (Ortega-Galisteo *et al.*, 2008). *DML3* mRNA was shown to be a specific target for the microRNA miR402 (Kim *et al.*, 2010) and when *DML3* mRNA degradation was induced by overexpressing miR402 under stress conditions, seed germination was accelerated. This thus suggests that when high methylation levels of cytosine were maintained in specific targeted sites, seed germination was prevented.

In this scheme, dormancy release in *P. ramosa* would consist in a two-step process starting with the conditioning period characterized by a global DNA demethylation required for the establishment of the second phase that corresponds to a GR24-dependent ABA catabolism. Among the actors involved in the response to GR24, *PrCYP707A1* was shown to be up-regulated only after a sufficient low 5-mC level was achieved suggesting that the expression of this gene was affected by this process and could thus be a key component of the seed germination. Interestingly, bromoethane (BE) has been shown to induce a significant transient decrease in 5-mC level in potato tuber meristems leading to a chemically forced dormancy release (Law & Suttle, 2003). Interestingly a BE treatment induced a strong up-regulation of three potato *CYP707A* genes explaining the dormancy break thanks to an enhanced ABA catabolism (Destefano-Beltrán *et al.*, 2006). These results indicate therefore that expression of *CYP707A* genes could be under control of epigenetic mechanisms such as DNA methylation. Using MeDIP, MS-PCR, and bisulfite sequencing approaches, DNA methylation status of the *PrCYP707A1* promoter was investigated in this study at the nucleotide level during the conditioning period. Two CpG islands were identified by *in silico* analysis, out of which only island 2 showed a significant demethylation of cytosine residues, all of them being mainly localized in a 78 nucleotide region. This site-specific decrease in 5-mC level is likely to permit the overexpression of this gene by SL and then an ABA catabolism conducting to seed germination.

These observed modifications in DNA methylation levels may result from tissue-specific effects (Meng *et al.*, 2012). Indeed, in wheat or other species, during the imbibition tissues surrounding the embryo were shown to be more intensively demethylated than the embryo (Lu *et al.*, 2006; Meng *et al.*, 2012). Interestingly, *PrCYP707A1* was shown to be expressed in the perisperm cells close to the micropyle a few hours after GR24 stimulation of *P. ramosa* seeds

(Lechat *et al*., 2012). This specific spatial mRNA accumulation could therefore be attributed to a spatial distribution of epigenetic modifications during seed germination as it has been already demonstrated in other models. This concerns for instance extensive DNA demethylation in *Arabidopsis* (Hsieh *et al.*, 2009), rice (Zemach *et al.*, 2010) or maize (Lauria *et al.*, 2004) endosperms and local histone modifications in *Brachypodium distachyon* embryon (Wolny *et al.*, 2014).

DNA demethylation may take place as a passive process due to a lack of methylation mainenance during several cycles of DNA replication, or as an active mechanism in the absence of replication (Roldán-Arjona & Ariza, 2009). Interestingly, the DNA demethylation observed during the conditioning period is not a continuous and progressive process but rather all or nothing process since a significant decrease only occurred after 3 days. This therefore suggests that an active mechanism could be triggered few days after seed imbibition. In *P. aegyptiaca*, Mayer *et al.* (1993) demonstrated a steady rate of thymidine incorporation during conditioning without any change of total DNA, indicating that the incorporation was not the consequence of any DNA replicative synthesis. In *Silene latifolia*, it was demonstrated that DNA demethylation that occurred during germination took place in a non-replicative process probably by active mechanisms (Zluvova *et al.*, 2001). Although this point needs to be confirmed in the future, it might then be suggested that the DNA demethylation observed during *P. ramosa* conditioning was not due to replication but rather to the activation of DNA glycosylase domain-containing proteins with the capacity to erase 5-mC.

Although experimental evidences from this study unequivocally established the importance of DNA methylation during seed germination of *P. ramosa*, other epigenetic modifications such as histone acetylation and/or methylation should however not be excluded and deserve to be further investigated in the context of broomrape seed germination. Indeed, global chromatin dynamic of some key regulatory genes have been shown to play major roles during plant seed life (Zhang & Ogas, 2009; Müller *et al.*, 2012).

Nevertheless, even if DNA methylation is considered as a modulator of chromatin structure influencing also transcriptional regulation (Reddington *et al.*, 2013), the inhibition of gene expression by DNA methylation is mainly known to be achieved through two general mechanisms: modification of cytosine that can hampered the transcriptional machinery (RNA polymerase II and transcription factors) to bind to important promoter DNA sequences (Watt et al., 1988), and/or repressing protein complexes that can specifically recognize methylated DNA (Boyes & Bird, 1991). In the case of *PrCYP707A1*, whatever the mechanisms involved is, while gene silencing should be released by a demethylation process, expression still required

to be triggered by environmental cues, namely the germination stimulants. The question to address would now be to know whether demethylation and GS stimulation are independent or closely linked processes. Several studies on shoot branching and root development has led to the definition of a model concerning the SL signaling pathway in which SL are bound to and hydrolysed by the α/β hydrolase protein D14 and interact with the nuclear localized F-box protein MORE AXILLARY GROWTH2 (MAX2). This complex is thought to select candidate proteins for ubiquitination and subsequent degradation by the 26S proteasome. Recently, few of these target proteins have been identified in rice (Zhou *et al.*, 2013) and *Arabidopsis* (Stanga *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2013a) and may act as transcription repressors. In this scheme, the degradation of these repressors would trigger downstream signaling events via gene up-regulation. Although the SL signaling pathway involved in the germination of parasitic plants has not been elucidated yet, some preliminary results indicate the likely implication of the α/β hydrolase/MAX2 complex in this process. At first, Nelson *et al.* (2013) have clearly demonstrated that at least one *Phelipanche aegyptiaca KAI2* paralog, encoding a α/β hydrolase homologous to D14, could restore the sensitivity of *Arabidopsis kai2* mutant seeds to GR24. Second, when the proteasome inhibitor MG132 is applied together with GR24, it inhibits *P. ramosa CYP707A1* up-regulation and seed germination (data not shown). Thus, one can consider that DNA methylation along with other epigenetic marks such as histone modifications may influence chromatin structure thereby rendering inaccessible a component of *PrCYP707A1* expression to the degradation by KAI2/MAX2 activity.

Regarding *P. ramosa* life cycle, the rationale of such a fine-tuned process might therefore be to afford the seeds the necessary time to set up germination and to prevent a premature activation of *PrCYP707A1*-dependent ABA catabolism by germination stimulant. Such a mechanism would thus be of major interest for the reproductive success of this parasitic plant.

Given the alarming impact of broomrape species on world agriculture, deciphering their developmental and metabolic particularities is then a necessary step toward the development of targeted control methods. Thus, every physiological and molecular events governing their germination process such as DNA methylation might be considered as a point of vulnerability that could be potentially exploited. Indeed, control of these parasitic weeds can be achieved by preventing seed germination through biocontrol agents or in contrast by promoting seed germination in the absence of host plants in order to reduce the seed bank of the soils. At a more fundamental level, our results demonstrate that DNA methylation is likely to be involved in the response of parasitic plant seeds to strigolactone. Whether an epigenetic control also influences

SL response modulating plant architecture, shoot branching and root growth, nevertheless still awaits investigation.

Conclusion

Bien que l'ABA soit une des hormones clé de la réponse aux strigolactones, l'étape de conditionnement n'est pas sous son contrôle. En effet, cette phytohormone n'impacte ni la durée de conditionnement, ni l'induction stimulant dépendante du gène *PrCYP707A1*. Le rôle inhibiteur de la germination de l'ABA n'intervient alors qu'une fois le conditionnement achevé. En revanche, l'étude a permis de démontrer que le conditionnement est régulé par des mécanismes épigénétiques, notamment par la déméthylation des cytosines de l'ADN. Une relation a pu être établie entre le taux de méthylation global et l'acquisition de la sensibilité aux stimulants de germination. En effet, alors que le maintien d'un taux élevé de méthylation inhibe le conditionnement, une chute précoce de celui-ci permet d'en diminuer sa durée minimale. Le conditionnement, correspondant à un changement d'état physiologique entre des graines insensibles et sensibles aux stimulants de germination, est contrôlé par une chute du taux de méthylation globale des cytosines de l'ADN. Cette hypothèse est de plus appuyée par le fait que le conditionnement (Murdoch and Kebreab, 2013) tout comme les processus épigénétiques (Richards, 1997) sont sous le contrôle des conditions environnementales. L'étude réalisée au niveau du promoteur du gène *PrCYP707A1* a en effet permis d'identifier, *in silico*, deux ilôts CpG, cibles potentielles de la déméthylation des cytosines l'ADN, dont l'un d'entre eux montre une chute du taux de méthylation des cytosines au cours du conditionnement. L'une des cibles de la démethylation, contrôlant le conditionnement, peut être le promoteur du gène *PrCYP707A1* au niveau de cet ilôt CpG. La déméthylation de cet îlot CpG au cours du conditionnement permettrait le passage d'état du gène *PrCYP707A1* de non-inductible à inductible par les stimulants de germination, et donc de graines non conditionnées à conditionnées.

Conclusion générale et perspectives

Adaptées à leur mode de vie parasitaire, la germination des graines des plantes parasites obligatoires des genres *Orobanche* et *Phelipanche* est particulière. Elle est sous la dépendance d'un signal biotique, une molécule stimulante, émise dans la rhizosphère par la plante hôte. Dans le cas de notre modèle d'étude *P. ramosa* (l'orobanche rameuse), la germination se déroule en 3 étapes : le Conditionnement, phase d'acquisition de la sensibilité aux SL, la phase de Réceptivité, au cours de laquelle la graine est capable de percevoir le stimulant de germination et la Stimulation (Fig. C.1A). Cette dernière s'enclenche après la perception de SL par la graine et permet l'achèvement de la germination. L'étude du modèle *Phelipanche ramosa* a permis d'identifier des mécanismes impliqués dans les deux processus physiologiques que sont le Conditionnement et la Stimulation. Tout d'abord un acteur majeur de la stimulation en réponse au GR24, *PrCYP707A1,* un gène de catabolisme de l'ABA a été mis en évidence dans les graines de *P. ramosa*. L'implication de ce gène dans la germination des plantes parasites obligatoires ou facultatives de la famille des *Orobanchaceae*, ainsi que son induction par différents stimulants de germination a ensuite été démontrée. Cette implication a également été observée au cours de la germination des graines d'*Arabidopsis thaliana,* en présence de SL, et a permis de préciser certains des acteurs moléculaires impliqués dans ce processus. Puis, à l'aide de ce marqueur précoce de réponse aux SL, l'étude du conditionnement a permis de mettre en évidence un mécanisme épigénétique régissant cette étape.

Dans un premier temps, l'étude du transcriptome précoce des graines conditionnées de *P. ramosa* en réponse au GR24, un analogue de synthèse des strigolactones, a fourni 58 gènes candidats, dont le gène *PrCYP707A1*. Ce gène, qui code pour une ABA-8'hydroxylase, catabolise l'acide abscissique. Il est surexprimé seulement 30 min après l'ajout du stimulant avec un maximum de surexpression atteint à 18h. La chute du contenu de la graine en ABA est alors détectée 3 jours après la stimulation et est suivie par la protrusion de la radicule (Fig. C.1B). La nécessité de cette activité, au cours de la stimulation, a été démontrée *via* l'utilisation d'un inhibiteur spécifique de cette enzyme, l'Abz-E2B, et l'inhibition par l'ABA. L'implication fonctionnelle des autres gènes candidats dans la germination n'a pas pu être validée. Parallèlement à l'expression de *PrCYP707A1,* une surexpression des gènes de la voie de biosynthèse des GA, *PrGA3ox1* et *PrGA20ox1,* a pu être observée 6h après stimulation (Chap I). L'ensemble de ces deux évènements conduit alors vraisemblablement à la diminution du ratio ABA/GA, ce qui entraine alors la levée de dormance et permet la germination (Rodriguez-Garcio et *al.,* 2009 ; Hoang et *al.,* 2012). Bien que les conditions d'induction de la germination

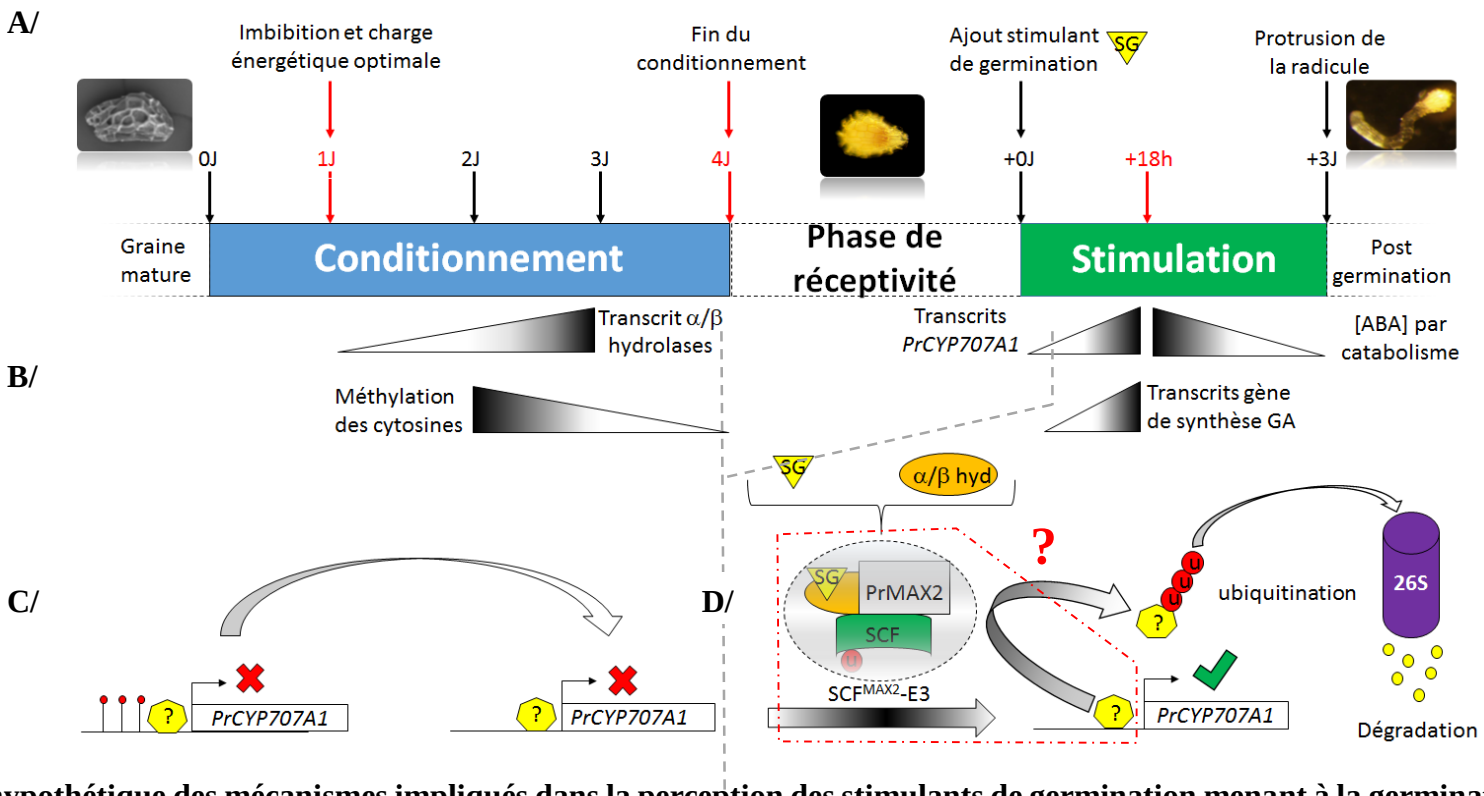


Fig. C.1 Schéma hypothétique des mécanismes impliqués dans la perception des stimulants de germination menant à la germination des plantes parasites des genres *Orobanche* et *Phelipanche*, basé sur le modèle de *Phelipanche ramosa*.

A/ La germination des plantes parasites se divise en trois étapes distinctes : l'étape de Conditionnement, la phase de Réceptivité, et la Stimulation. L'étape de conditionnement, dans nos conditions expérimentales, est de 4J. Au cours de la 1ère journée de conditionnement, l'imbibition et la charge énergétique deviennent optimales. **B/** Entre le 1er et le 3ème jour, le taux de transcrits codant pour des α/β hydrolases augmente. De manière conjointe, entre le 2ème et le 4ème jour, le taux de méthylation des cytosines chutes, aboutissant à la réceptivité des graines aux SG. Suite à la perception des SG, le taux de transcrit *PrCYP707A1* augmentent alors dès 30 min avant d'atteindre un maximum à 18h. En parallèle, 6h post stimulation, les gènes de la voie de biosynthèse des GA se voient surexprimés. Une chute de la concentration en ABA endogène est alors enregistrée au bout de 3J post stimulation, entrainant une diminution du ratio ABA/GA. **C/** L'une des cibles de la déméthylation observée lors du conditionnement est le promoteur du gène *PrCYP707A1*. **D/** Le SG est perçu par une α/β hydrolase, ce qui permet sa liaison à la protéine PrMAX2 et la formation du complexe d'ubiquitination SCF^{MAX2}-E3. Celui-ci va alors permettre l'ubiquitination d'un potentiel répresseur de transcription présent sur le promoteur du gène *PrCYP707A1*, afin de l'adresser au protéasome 26S pour dégradation, et permettre l'expression du gène *PrCYP707A1*.

soient différentes entre les plantes parasites et non parasites, les mécanismes mis en œuvre afin d'accomplir la germination semblent donc ensuite communs.

L'induction d'un gène *CYP707A*, en réponse aux différents stimulants de germination, est un processus conservé et nécessaire à la germination des plantes parasites obligatoires appartenant aux *Orobanchaceae*, qu'elles soient hemi- ou holoparasites. En effet, les différentes molécules induisant une germination effective ont toutes en commun l'induction d'un unique gène *CYP707A* (Chap II). En revanche, chez *P. ramosa*, le gène *PrCYP707A1* n'est pas induit par des facteurs abiotiques tels que la lumière et le stress oxydatif (Chap III), comme cela peut être le cas des gènes *CYP707A* chez d'autres plantes parasites et non parasites. Chez *Tryphisara versicolor*, plante parasite facultative appartenant aux *Orobanchaceae*, un orthologue de ce gène répondant au GR24 a été mis en évidence, *TvCYP707A1*. En plus de ce gène, deux autres copies *TvCYP707A2* et *TvCYP707A3* exprimées au cours de la germination mais non induites par le GR24, ont été identifiées. La proximité des séquences des gènes *CYP707A* répondant aux SL dans la germination au sein des *Orobanchaceae* nous permet alors de proposer que les plantes parasites obligatoires auraient perdu, au cours de l'évolution, les différents gènes *CYP707A* dont l'induction est sous contrôle abiotique, alors que ceux-ci sont encore présents chez les plantes parasites facultatives. Elles ne conserveraient que l'orthologue de ce gène dont l'induction est sous contrôle biotique par les stimulants de germination.

La surexpression en réponse aux SL d'un seul gène *AtCYP707A*, été mise en évidence dans la germination des graines d'*A. thaliana*, le gène *AtCYP707A3*. L'utilisation du mutant *Atcyp7073* permet d'identifier ce gène comme l'acteur clé dans l'amélioration du taux de germination en réponse au SL, de graines en dormance primaire et à l'obscurité, conditions limitantes pour la germination. La surexpression de ce gène en réponse aux SL expliquerait également les réponses observées en thermoinhibition ou en dormance primaire (Toh et *al.*, 2012; Nelson et *al.*, 2009; Stanga et *al.*, 2013). Une voie de transduction d'un signal strigolactone ou SL-like aboutissant à l'induction d'un gène *CYP707A*, au cours de la germination, est donc présente chez les plantes parasites comme chez les non parasites (Chap II). L'utilisation des modèles *A. thaliana* et *P. ramosa* a permis de mettre en évidence que cette voie, chez les deux modèles, implique la protéine MAX2 à domaine F-box et le protéasome 26S. En effet chez les mutants *Atmax2*, le gène *AtCYP707A3* n'est pas induit en réponse au SL. De même, chez *P. ramosa*, en présence d'un inhibiteur du protéasome 26S, le MG132, la surexpression de *PrCYP707A1* n'est pas observée. Par ailleurs, un gène orthologue *ShMAX2* fonctionnel a été mis en évidence chez *Striga hermonthica* (Stanga et *al.*, 2013). Nous

proposons donc l'implication d'un homologue de la protéine MAX2, et du protéasome 26S dans la voie de transduction des strigolactones aboutissant à la germination des plantes parasites (Fig. C.1D).

Chez *A. thaliana*, les récepteurs aux SL ou SL-like (KARs) sont des protéines α/β hydrolases, notamment KAI2 et D14 (Waters et *al.*, 2012). L'intervention de ces récepteurs dans la perception des SL par les graines de *P. ramosa* est alors probable. En effet, par homologie, 6 gènes codants pour des α/β hydrolases, 5 gènes *KAI2* et 1 gène *D14* ont été identifiés chez cette dernière. De plus, l'activité de type α/β hydrolase est nécessaire à la voie de transduction des SL menant à la germination de *P. ramosa*, comme le démontre l'inhibition de la germination en réponse au PMSF, inhibiteur large d'hydrolases (Chap III). De plus, des expériences de complémentation de mutant d'*A. thaliana Atkai2* par les gènes *PaKAI2* de *P. aegyptiaca* ont récemment permis de démontrer que les protéines codées par les gènes *PaKAI2* permettent la perception des SL au cours de la germination. (Nelson et *al.*, WCPP2012, Sheffield, UK). Les protéines KAI2 semblent donc être des candidats sérieux au titre de récepteurs des SG chez les plantes parasites. Contrairement à *A. thaliana*, la diversité des gènes *PrKAI2* confrontée à celles des structures chimiques des SG induisant la germination de *P. ramosa* suggèrent une diversification des récepteurs adaptés à la perception de chaque stimulant de germination (Fig. C.1 D).

Ces points communs entre les deux modèles nous permettent alors de proposer un modèle de transduction du signal SL/SG dans la germination de *P. ramosa* similaire à celui connu chez *A. thaliana*, (Fig. C.1D). Dans ce dernier, chaque SG est perçu par des α/β hydrolases qui se lient alors à la protéine *PrMAX2*, entrainant la formation du complexe d'ubiquitination $PrSCF^{PrMAX2}$-E3. Celui-ci va alors permettre l'ubiquitination d'un potentiel répresseur de transcription présent sur le promoteur du gène *PrCYP707A1*, afin de l'adresser aux protéasome 26S pour dégradation. La surexpression de ce dernier induit alors une dégradation de l'ABA qui lève la dormance des graines. La germination se poursuit et s'achève 3 jours post-stimulation par la protrusion de la radicule.

Finalement, les travaux présentés ont apporté un nouvel éclairage quant aux mécanismes se déroulant au cours du conditionnement chez *P. ramosa*. Ainsi, nous avons pu démontrer que, dans nos conditions expérimentales, le conditionnement des graines de *P. ramosa* est de 4 jours (Fig. C.1A). Tant que cette période n'est pas achevée, contrairement à ce qui s'observe pendant la phase de réceptivité, le gène *PrCYP707A1* n'est pas inductible par les SL dans les graines. Dès le premier jour de conditionnement, les graines achèvent l'imbibition et atteignent une

charge énergétique optimale (Fig. C.1A). De plus, les gènes des récepteurs putatifs aux SG, les α/β hydrolases, sont également exprimées dès le premier jour avec un optimum au 3ème jour (Fig. C.1A). Nous avons montré que cet état non conditionné était un état de dormance sous contrôle épigénétique. En effet, une chute globale du taux de méthylation des cytosines (5-méthyl cytosines) de l'ADN a lieu entre le 3ème et le 4ème jour de conditionnement. De plus, la durée du conditionnement peut être modifiée par des molécules hypo- ou hyperméthylantes en lien avec ce taux de méthylation. Par ailleurs, l'analyse de la structure du promoteur du gène *PrCYP707A1* a permis de mettre en évidence deux îlots CpG, dont un est déméthylé au cours du conditionnement au niveau de 8 cytosines. La méthylation de l'ADN étant une marque inhibitrice de la transcription génique, l'insensibilité des graines aux SL, l'état non conditionné, peut-être relié à l'impossibilité d'induire le gène *PrCYP707A1* du fait de son statut hyperméthylé. Le conditionnement correspondrait donc à une première étape de levée de dormance, due à une déméthylation de l'ADN, en particulier du promoteur du gène *PrCYP707A1* (Fig. C.1B-C).

La germination des plantes parasites nécessite donc deux étapes de levée de dormance. La première, lors du conditionnement, est sous contrôle abiotique par un processus épigénétique, la modification du taux de méthylation des cytosines. Elle permet l'acquisition de la sensibilité aux stimulants de germination et l'inductibilité du catabolisme de l'ABA. La seconde, lors de la stimulation, est sous contrôle biotique par la perception des stimulants de germination qui entraine une baisse du ratio ABA/GA. Elle termine alors la levée de dormance et permet l'achèvement de la germination. L'ensemble de ce travail permet alors de proposer un modèle, certes encore fragmentaire mais cohérent, des étapes de germination de notre modèle d'étude *Phelipanche ramosa* (Fig C.1).

Ces travaux soulèvent néanmoins différentes questions et ouvrent plusieurs perspectives. Tout d'abord, bien que l'activité de l'ABA-8'hydroxylase ait été démontrée comme étant nécessaire à la germination, nous ne savons pas si celle-ci est suffisante pour la déclencher. Ainsi, l'induction des gènes de la voie de biosynthèse des GA, détectée à 6h après stimulation, est-elle sous dépendance du catabolisme de l'ABA ou est-elle une voie parallèle directement induite par les SG? L'indisponibilité de mutants et de technique aisée de transformation des plantes parasites est longtemps restée un frein à la compréhension de la biologie des plantes parasites. De récents progrès réalisés au laboratoire au niveau des techniques de transformation de la plante *P. ramosa*, permettent cependant d'envisager la transformation stable de cals et la redifférenciation d'une plante parasite viable après leur mise en contact avec les racines de

l'hôte. De cette façon, il serait possible de faire surexprimer le gène indépendamment des SL en transformant des cals à l'aide d'une construction comprenant un promoteur inductible ne répondant pas aux SL, couplé au gène *PrCYP707A1*. Les graines obtenues permettront d'éventuellement valider le rôle prépondérant du catabolisme de l'ABA dans la germination des graines d'orobanche.

De nombreux acteurs du modèle proposé dans la transduction du signal SG sont par ailleurs à valider. L'utilisation combinée du modèle de la germination d'*A. thaliana* de graines en dormance primaire à l'obscurité et celle de *P. ramosa* en réponse au SL ou SL-like permettrait de progresser. Dans un premier temps, le rôle des α/β hydrolases de *P. ramosa* en tant que récepteurs aux différents stimulants de germination, pourrait être caractérisé. Pour cela, une stratégie de complémentation du mutant *Atkai2* insensible aux SL (Nelson et *al.*, 2011) par les différents gènes *PrKAI2* peut être réalisée. Différents stimulants de germination pourront alors être testés sur les différents transformants afin de déterminer quelle(s) combinaison(s) KAI2-SG sont éventuellement actives pour permettre la germination et l'induction d'*AtCYP707A3*. La possibilité d'induction de *AtCYP707A3* et de germination par ce système étayerait par ailleurs l'hypothèse du recrutement d'un voie de germination SG-dépendante commune à *P. ramosa* et *A. thaliana* et donc sa conservation au cours de l'évolution. De la même manière, la fonctionnalité de la protéine PrMAX2, homologue d'AtMAX2 pourrait être validée par la complémentation du mutant *Atmax2*, comme cela a été fait pour celle de *Striga hermonthica* (Stanga et *al*, 2014). Par ailleurs, les protéines interagissant avec MAX2 restent à caractériser, que ce soit les membres du complexe d'ubiquitination SCF ou les cibles ubiquitinées. Différentes approches d'études des interactions protéines-protéines peuvent être envisagées pour cela, notamment par une approche TAP-tag (Tandem Affinity Purification) utilisant une protéine recombinante *PrMAX2* étiquetée, produite chez *A. thaliana* et purifiée de manière sélective par chromatographie le complexe moléculaire formé avec cette protéine recombinante. De plus, l'étude et la comparaison des promoteurs des gènes *PrCYP707A1* et *AtCYP707A3*, par des approches *in silico* permettrait d'identifier un possible SRE (Strigolactone Response Element), une séquence régulatrice de l'expression de ce gène en réponse aux SL conservé ou non entre ces deux phylums. Cette séquence serait à ce jour le site de fixation d'un inhibiteur de la transcription ubiquitiné par le complexe SCF^{MAX2}-E3. Auquel cas il s'agirait de purifier cet inhibiteur, et de vérifier d'une part par gel retard sa fixation au promoteur du gène *PrCYP707A1*, et d'autre part son site exact de fixation par DNA footprinting.

L'étude de l'étape de conditionnement a permis de mettre en évidence l'existence de phénomènes épigénétiques au cours de cette phase. Une démethylation de certaines zones du promoteur *PrCYP707A1* est ainsi corrélée à la possibilité d'induction de ce gène par les strigolactones. Le rôle de la méthylation au niveau du promoteur *PrCYP707A1* en tant que verrou à lever pour aboutir à la sensibilité aux stimulants de germination, reste cependant à être validé. Il est pour cela envisageable de transformer des cals de *P. ramosa* avec un promoteur *PrCYP707A1* tronqué de la zone déméthylée, afin de vérifier son induction par les SL chez des graines non conditionnées. Par ailleurs, on pourrait vérifier que l'inaptitude des graines à répondre aux strigolactones avant la fin du conditionnement n'est pas due à la non-fonctionnalité de la voie de signalisation des SL. Pour répondre à cette question, il est envisageable de regarder le profil d'expression de *PrMAX2*, acteur central de la voie de transduction des strigolactones, ainsi que le profil d'expression d'un marqueur transcriptionnel de la réponse aux strigolactones, tel que D14-LIKE2 (Nelson et *al.*, 2013), chez des graines non conditionnées.

La baisse du taux de méthylation global observée au cours du conditionnement ne peut pas seulement être imputée à la chute de méthylation du promoteur *PrCYP707A1*. Il existe donc d'autres cibles de la déméthylation au cours du conditionnement, dont certaines pourraient être impliquées dans la réponse des graines aux stimulants de germination. À ce jour, l'absence de données génomiques chez les plantes parasites et *P. ramosa* en particulier, rendent difficilement envisageables des approches de type analyse globale du méthylome. En revanche, le caractère tranché de la transition état non conditionné/état conditionné rendrait intéressante la recherche d'éventuels acteurs exprimés de manière différentielle entre ces deux états. Des approches globales de type transcriptomiques ou protéomiques sont alors envisageables.

Enfin, plusieurs processus épigénétiques agissent souvent en synergie dans la régulation de l'expression d'un gène (Chan *et al.*, 2005). L'étude d'autres marques épigénétiques peuvent alors être envisagées, tant en ce qui concerne le promoteur du gène *PrCYP707A1* que d'autres gènes candidats impliqués dans la signalisation des strigolactones. Il est ainsi envisageable de suivre l'évolution de la compaction chromatinienne, au cours du conditionnement notamment par l'étude de l'encombrement nucléosomique au niveau des promoteurs des gènes candidats. Pour répondre à cette question, des techniques de type FAIRE (Formaldehyde-Assisted Isolation of Regulatory Elements) peuvent être employées. Les modifications chimiques de la chromatine, telles que l'acétylation ou la méthylation des histones, notamment au niveau de l'histone H3, sont également des marques épigénétiques capables d'affecter la compaction de la chromatine et la réponse transcriptionnelle. Des approches de type ELISA (Enzyme-Linked

Immunosorbent Assay) ou Western Blot peuvent pour cela être envisagées afin de suivre l'évolution du statut chimique des histones liées à la transcription, au cours du conditionnement.

À long terme, les connaissances apportées par ce travail sur le développement précoce de l'orobanche permettraient d'envisager des méthodes de lutte pour limiter la propagation des plantes parasites. Ainsi chez l'ensemble des plantes parasites obligatoires étudiées, l'ensemble des SG convergent vers une action sur l'expression d'un gène *CYP707A1*. Cette convergence des voies vers un même acteur permet d'envisager d'un point de vue agronomique, le développement de composés chimiques ciblant particulièrement cette enzyme afin de bloquer l'interaction hôte-plante parasite dès l'étape initiale. Cette *CYP707A* semblant facultative pour les plantes non parasites, l'impact sur les cultures hôtes pourrait de plus être limité. Par ailleurs, La diversité des séquences des récepteurs putatifs soulève la question de la diversification et de la duplication de ces gènes au cours de l'évolution au sein du phylum des *Orobanchaceae*. Une étude phylogénique et fonctionnelle de ces gènes permettrait de comprendre l'implication de la perception du signal biotique, SG, dans les phénomènes de spéciation au sein des plantes parasites et dans la relation plante-plante parasite.

Références bibliographiques

-A-

Abbes Z, Kharrat M, Delavault P, Chaibi W, Simier P. 2009. Nitrogen and carbon relationships between the parasitic weed *Orobanche foetida* and susceptible and tolerant faba bean lines. *Plant Physiology and Biochemistry* **47**, 153-159.

Aber M, Fer A, Salle G. 1983. Étude du transfert des substances organiques de l'hôte (*Vicia faba*) vers le parasite (*Orobanche crenata* Forsk.). Z *Pflanzenphysiol Bd* **112**, 297-308.

Alder A, Jamil M, Marzorati M, Mark Bruno M, Vermathen M, Bigler P, Ghisla S, Harro Bouwmeester HJ, Beyer P, Al-Babili A. 2012. The path from β-carotene to carlactone, a strigolactone-like plant hormone. *Science* **335**, 1348–1351.

Arite T, Umehara M, Ishikawa S, Hanada A, Maekawa M, Yamaguchi S, and Kyozuka J. 2009. *d14*, a Strigolactone-Insensitive Mutant of Rice, Shows an Accelerated Outgrowth of Tillers. *Plant and Cell physiology* **50-8**, 1416-1424.

Attucci S, Carde JP, Raymond P, Saint-Ges V, Spiteri A, and Pradet A. 1991 Oxidative phosphorylation by mitochondria extracted from dry sunflower seeds. *Plant Physiolology* **95**,390–39.

Auger B, Pouvreau JB, Pouponneau K, Yoneyama K, Montiel G, Le Bizec B, Delavault P, Delourme R, Simier P. 2012. Germination stimulants of *Phelipanche ramosa* in the Rhizosphere of *Brassica napus* are derived from the glucosinolate pathway. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **25**, 993–1004.

Aviezer-Hagai K, Skovorodnikova J, Galigniana M, Farchi-Pisanty O, Maayan E, Bocovza S, Efrat Y, von Koskull-Döring P, Ohad N, Breiman A. 2007. *Arabidopsis* immunophilins ROF1 (*AtFKBP62*) and ROF2 (*AtFKBP65*) exhibit tissue specificity, are heat-stress induced, and bind HSP90. *Plant Molecular Biology* **63,** 237–255.

-B-

Baskin CC, Baskin JM. 1998. Seeds: Ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination. Academic Press **ISBN-10:** 0120802635.

Baskin JM, Baskin CC. 2004. A classification system for seed dormancy. *Seed Science Research* **14**, 1-16.

Bar Nun N, Mayer AM. 1993 Preconditioning and germination of *Orobanche* seeds: Respiration and protein synthesis. *Phytochemistry* **34-1**, 39–45.

Bar Nun N and Mayer AM. 2002. Composition of and changes in storage compounds in *Orobanche aegyptiaca* seeds during preconditioning. *Israel Journal of Plant Sciences* **50**, 278–279.

Bar Nun N, Mayer AM. 2005. Smoke chemicals and coumarin promote the germination of the parasitic weed *Orobanche aegyptiaca*. *Israel Journal of Plant Sciences* **53**, 97–101.

Bazin J, Batlla D, Dussert S, El-Maarouf-Bouteau H, Bailly C. 2011. Role of relative humidity, temperature, and water status in dormancy alleviation of sunflower seeds during dry after-ripening. *Journal of Experimental Botany* **62**, 627–640.

Beltran-Petia E, Ortiz-López A, and Sanchez de Jiménez E. 1995. Synthesis of ribosomal proteins from stored mRNAs early in seed germination. *Plant Molecular and. Biology* **28**, 327-336.

Ben-Hod G, Nun NB, Tzaban S, Mayer AM. 1997. Inhibitors of polygalacturonase in calli of *Orobanche aegyptiaca*. *Phytochemistry* **45**, 1115-1121.

Bentsink L, and Koornneef M. 2002. Seed dormancy and germination. In *The Arabidopsis book*: The American Society of Plant Biologists.

Besserer A, Puech-Pagès V, Kiefer P, Gomez-Roldan V, Jauneau A, Roy S, Portais J-C, Roux C, Bécard G, Séjalon-Delmas N. 2006. Strigolactones stimulate arbuscular mycorrhizal fungi by activating mitochondria. *PLoS Biology* **4,** e226.

Bethke PC, Badger MR, Jones RL. 2004. Apoplastic synthesis of nitric oxide by plant tissues. *Plant Cell* **16**, 332-341.

Bethke PC, Libourel IG, Jones RL. 2006. Nitric oxide reduces seed dormancy in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* **57**, 517-526.

Bewley JD and BLack M. 1982. Physiology and biochemistry of seeds in relation to germination, Viability, dormancy and environmental control. *Springer-Verlag*: Berlin, 375 pp.

Bewley, JD, and Marcus A. 1990. Gene expression in seed development and germination. *Progres in Nucleic Acid Research.* MOI. Biol. 38,165-1 93.

Bewley, JD, and Black M. 1994. Seeds: Physiology of development and germination. *Seed Science Research* **5**, 127-128.

Bewley JD. 1997. Seed Germination and Dormancy. *Plant Cell* **9**, 1055-1066.

Bird A. 2002. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes & development* **16**, 6–21.

Booker J, Sieberer T, Wright W, Williamson L, Willett B, Stirnberg P, Turnbull C, Srinivasan M, Goddard P, Leyser O. 2005. MAX1 encodes a cytochrome P450 family member that acts downstream of MAX3/4 to produce a carotenoid-derived branch-inhibiting hormone. *Developmental Cell* **8**, 443–449.

Borisjuk L, Macherel D, Benamar A, Wobus U, Rolletschek H. 2007. Low oxygen sensing and balancing in plant seeds: a role for nitric oxide. *New Phytologist* **176,** 813–823.

Bouwmeester HJ, Matusova R, Zhongkui S, Beale MH. 2003. Secondary metabolite signalling in host–parasitic plant interactions. *Current Opinion in Plant Biology* **6**, 358–364.

Boyes J, Bird A. 1991. DNA methylation inhibits transcription indirectly via a methyl-CpG binding protein. *Cell* **64**, 1123–1134.

Brault M, Betsou F, Jeune B, Tuquet C, Salle G. 2007. Variability of *Orobanche ramosa* populations in France as revealed by cross infestations and molecular markers. *Environmental and Experimental Botany* **61**, 272–280.

-C-

Carrera E, Holman T, Medhurst A, Peer W, Schmuths H, Footitt S, Theodoulou FL, Holdsworth MJ. 2007. Gene expression profiling reveals defined functions of the ATP-binding cassette transporter COMATOSE late in phase II of germination. *Plant Physiology* **143**, 1669-1679.

Carrera E, Holman T, Medhurst A, Dietrich D, Footitt S, Theodoulou FL, Holdsworth MJ. 2008. Seed after-ripening is a discrete developmental pathway associated with specific gene networks in *Arabidopsis*. *Plant Journal* **53**, 214-224.

Castejon-Munoz M, Romero-Munoz F, Garcia-Torres L. 1991. *Orobanche cernua* seed dispersal through sunflower achenes. *Helia* **14**, *51-54*.

Causier B, Ashworth M, Guo W, and Davies B. 2012. The TOPLESS interactome: a framework for gene repression in *Arabidopsis*. *Plant physiology* **158-1**, 423-38.

Chae SH, Yoneyama K, Takeuchi Y, Joel DM. 2004. Fluridone and norflurazon, carotenoid-biosynthesis inhibitors, promote seed conditioning and germination of the holoparasite *Orobanche minor*. *Physiologia Plantarum* **120,** 328–337.

Chan SW-L, Henderson IR, Jacobsen SE. 2005. Gardening the genome: DNA methylation in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Reviews Genetics* **6**, 351–360.

Chen M, Lv S, Meng Y. 2010. Epigenetic performers in plants‡. *Development, Growth & Differentiation* **52**, 555–566.

Chibani K, Ali-Rachedi S, Job C, Job D, Jullien M, Grappin P. 2006. Proteomic analysis of seed dormancy in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **142**, 1493-1510.

Chinnusamy V, Gong Z, Zhu J-K. 2008. Abscisic acid-mediated epigenetic processes in plant development and stress responses. *Journal of Integrative Plant Biology* **50**, 1187–1195.

Clément M, Leonhardt N, Droillard M-J, Reiter I, Montillet J-L, Genty B, Laurière C, Nussaume L, Noël LD. 2011. The cytosolic/ nuclear HSC70 and HSP90 molecular chaperones are important for stomatal closure and modulate abscisic acid-dependent physiological responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **156,** 1481–1492.

Conaway RC, Brower CS, Conaway JW. 2002. Emerging roles of ubiquitin in transcription regulation. *Science* **296**, 1254–1258.

Cook CE, Whichard LP, Turner B, Wall ME, Egley GH. 1966. Germination of Witchweed (*Striga lutea* Lour.): Isolation and Properties of a Potent Stimulant. *Science* **154**, 1189–1190.

Crawford S, Shinohara N, Sieberer T, Williamson L, George G, Hepworth J, Müller D, Domagalska MA, Leyser O. 2010. Strigolactones enhance competition between shoot branches by dampening auxin transport. *Development* **137,** 2905–2913.

Crowe LM and Crowe JH. 1992 Anhydrobiosis: a strategy for survival. *Advances in Space Research* **12**, 239-247.

-D-

Dave A, Luisa Hernandez ML, He Z, Andriotis VME, Vaistij FE, Larson TR, Graham IA. 2011. 12-Oxo-Phytodienoic Acid Accumulation during Seed Development Represses Seed Germination in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **23**, 58–599.

Daws MI, Pritchard HW, Van Staden J. 2008. Butenolide from plant-derived smoke functions as a strigolactone analogue: evidence from parasitic weed seed germination. *South African Journal of Botany* **74**, 116–120.

De Saint Germain A, Bonhomme S, Boyer FD, and Rameau C. 2013. Novel insights into strigolactone distribution and signalling. *Current Opinion in Plant Biology* **16**, 583–589.

Debeaujon I, and Koornneef M. 2000. Gibberellin requirement for *Arabidopsis* seed germination is determined both by testa characteristics and embryonic abscisic acid. *Plant Physiology* **122**, 415-24.

Delaux PM, Xie X, Timme RE, Puech-Pages V, Dunand C, Lecompte E, Delwiche CF, Yoneyama K, Becard G, Séjalon-Delmas N. 2012. Origin of strigolactones in the green lineage. *New Phytologist* **195**, 857-871.

Delavault P, Simier P, Thoiron S, Veronesi C, Fer A, Thalouarn P. 2002. Isolation of mannose 6-phosphate reductase cDNA, changes in enzyme activity and mannitol content in boomrape (*Orobanche ramosa*) parasitic on tomato roots. *Physiologia Plantarum* **115**, 48-55.

Destefano-Beltrán L, Knauber D, Huckle L, Suttle J. 2006. Chemically forced dormancy termination mimics natural dormancy progression in potato tuber meristems by reducing ABA content and modifying expression of genes involved in regulating ABA synthesis and metabolism. *Journal of experimental botany* **57**: 2879–2886.

Dube MP, Olivier A. 2001. *Striga gesnerioides* and its host, cowpea: interaction and methods of control. *Canadian Journal of Botany* **79**, 1225-1240.

Dun EA, de Saint Germain A, Rameau C, Beveridge CA. 2012. Antagonistic action of strigolactone and cytokinin in bud outgrowth control. *Plant Physiology* **158,** 487–498.

Draie R. 2009. Effet du greffage sur la productivité de la tomate en condition de non infestation et d'infestation par l'orobanche. Caractérisation d'une invertase acide, enzyme majeure de la force de puits du parasite. Thèse de doctorat. Université de Nantes, Nantes.

-E-

Edwards WG, Harborne JB. Ed 1972. Orobanche and other plant parasite factors. Academic Press, London, pp. 235–248 *Phytochemical Ecology.*

Ehrenshaft M, Brambl R. 1990. Respiration and mitochondrial biogenesis in germinating embryos of maize *Plant Physiology* **93**, 295–304.

Estabrook EM, Yoder JI. 1998. Plant–plant communications: rhizosphere signaling between parasitic angiosperms and their hosts. *Plant Physiology* **116,** 1–7.

Evidente A, Andolfi A, Fiore M, Boari A, and Vurro M. 2006. Stimulation of *Orobanche ramosa* seed germination by fusicoccin derivatives: A structure–activity relationship study. *Phytochemistry* **67**, 19–26.

Evidente A, Fernandez-Aparicio M, Cimmino A, Rubiales D, Andolfi A, Motta A. 2009. Peagol and peagoldione, two new strigolactone-like metabolites isolated from pea root exudates. *Tetrahedron Letters* **50**, 6955–6958.

Evidente A, Cimmino A, Fernández-Aparicio M, Andolfi A, Rubiales D, Motta A. 2010. Polyphenols, including the new peapolyphenols A–C, from pea root exudates stimulate *Orobanche foetida* seed germination. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **58,** 2902–2907.

Evidente A, CimminoA, Fernandez-Aparicio M, Rubiales D, Andolfi A, Melck D. 2011. Soyapogenol B and *trans*-22-dehydrocampestrol from common vetch (*Vicia sativa* L.) root exudates stimulate boomrape seed germination. *Pest management Science* **67**, 1015-1022.

-F-

Finch-Savage WE, Leubner-Metzger G. 2006. Seed dormancy and the control of germination. *New Phytologist* **171**, 501-523.

Finkelstein R, Lynch T. 2000. The *Arabidopsis* abscisic acid response gene ABI5 encodes a basic leucine zipper transcription factor. *Plant Cell* **12**, 599–609.

Finkelstein R, Reeves W, Ariizumi T, Steber C. 2008. Molecular aspects of seed dormancy. *Annual Review of Plant Biology* **59**, 387-415.

Finnegan EJ, Brettell RI, Dennis ES. 1993. The role of DNA methylation in the regulation of plant gene expression. *Exeperientia Supplementum* **64**: 218–261.

Finlayson SA, Krishnareddy SR, Kebrom TH, Casal JJ. 2010. Phytochrome regulation of branching in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **152**, 1914-1927.

Flematti GR, Ghisalberti EL, Dixon KW, and Trengove RD. 2004. A compound from smoke that promotes seed germination. *Science* **305**, 977.

Foy CL, Jain R, Jacobsohn R. 1989. Recent appraoches for chemical control of broomrape (*Orobanche spp.*). *Review of weed science*, **4**, 123-152.

-G-

Gaiji N, Cardinale F, Prandi C, **Bonfante P, Ranghino G.** 2012. The computational-based structure of Dwarf14 provides evidence for its role as potential strigolactone receptor in plants. *BioMedCentral Research Notes* **5**, 307.

Garcia M, Lynch T, Peeters J, Snowden C, Finkelstein R. 2008. A small plant-specific protein family of ABI five binding proteins (AFPs) regulates stress response in germinating *Arabidopsis* seeds and seedlings. *Plant Molecular Biology* **67,** 643–658.

Garciarrubio A, Legaria JP, and Covarrubias AA. 1997. Abscisic acid inhibits germination of mature *Arabidopsis* seeds by limiting the availability of energy and nutrients. *Planta* **203,** 182–187.

Gehring M, Henikoff S. 2007. DNA methylation dynamics in plant genomes. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression* **1769**, 276–286.

Gibot-Leclerc S, Brault M, Pinochet X, Sallé G. 2003. Potential role of winter rape weeds in the extension of broomrape in Poitou-Charentes. *Comptes rendus biologies* **326**: 645–658.

Gibot-Leclerc S, Corbineau F, Sallé G, Côme D. 2004. Responsiveness of *Orobanche ramosa* L. Seeds to GR 24 as Related to Temperature, Oxygen Availability and Water Potential During Preconditioning and Subsequent Germination. *Plant Growth Regulation* **43**, 63–71.

Gibot-Leclerc S, Sallé G, Reboud X, Moreau D. 2012. What are the traits of *Phelipanche ramosa* (L.) Pomel that contribute to the success of its biological cycle on its host *Brassica napus* L. *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants* **207**, 512–521.

Gibot-Leclerc S, Dessaint F, Reibel C, Le Corre V. 2013. *Phelipanche ramosa* (L.) Pomel populations differ in life-history and infection response to hosts. Flora-Morphology, Distribution, *Functional Ecology of Plants* **208**, 247–252.

Goldstein S, Russo A, Samuni A. 2003. Reactions of PTIO and carboxy-PTIO with NO, NO2, and O2. *Journal of Biological Chemistry.* **51**:50949-55.

Gomez-Roldan V, Fermas S, Brewer PB, Puech-Pages V, Dun EA, Pillot JP, Letisse F, Matusova R, Danoun S, Portais J-C, *et al.* 2008. Strigolactone inhibition of shoot branching. *Nature* **455**, 189–194.

Gomi K, Sasaki A, Itoh H, Ueguchi-Tanaka M, Ashikari M, Kitano H, and Matsuoka M. 2004. GID2, an F-box subunit of the SCF E3 complex, specifically interacts with phosphorylated SLR1 protein and regulates the gibberellin-dependent degradation of SLR1 in rice. *Plant Journal* **37**, 626–634.

Gruenbaum Y, Naveh-Many T, Cedar H, Razin A. 1981. Sequence specificity of methylation in higher plant DNA. *Nature* **292**: 860–862.

Gubler F, Millar AA, Jacobsen JV. 2005. Dormancy release, ABA and pre-harvest sprouting. *Current Opinion in Plant Biology* **8**, 183–187.

-H-

Hamiaux C, Drumond RSM, Janssen BJ, Ledger SE, Cooney JM, Newcomb RD, and Snowden KC. 2012. DAD2 is an α/β Hydrolase likely to be involved in the perception of the plant branching hormone, strigolactones. *Current Biology* **22-21**, 2032-6.

Hibberd JM, Jeschke WD. 2001. Solute flux into parasitic plants. *Journal of Experimental Botany* **52**, 2043–2049.

Hilhorst HWM. 1995. A critical update on seed dormancy. I. Primary dormancy. *Seed Science Research* **5**, 61-73.

Hilhorst HWM.2007. Definition and hypotheses of seed dormancy. In: K.J. Bradford and H. Nonogaki (Eds.) Chapter 4: Seed development, dormancy and germination. *Annual Plant Reviews* Vol. **27**. Blackwell Publishing, Sheffield, UK, pp 50-71.

Hoang HH, Sotta B, Gendreau E, Bailly C, Leymarie J, Corbineau F. 2012. Water content: a key factor of the induction of secondary dormancy in barley grains as related to ABA metabolism. *Physiologia Plantarum* **148**, 284-96.

Holdsworth M.J, Bentsink L and Soppe W.J.J, 2008. Molecular networks regulating *Arabidopsis* seed maturation, afterripening, dormancy and germination. *New Phytologist* **179,** 33-54.

Hsieh T-F, Fischer RL. 2005. Biology of chromatin dynamics. *Annual Review of Plant Biology* **56**, 327–351.

-J-

Jacobsohn R, Ben-Ghedalia D, Marton K. 1987. Effect of the animal's digestive system on the infectivity of *Orobanche* seeds. *Weed Research* **27**, 87-90.

Jia K-P, Luo Q, He S-B, Lu X-D, Yang H-Q. 2014. Strigolactone-regulated hypocotyl elongation is dependent on cryptochrome and phytochrome signaling pathways in *Arabidopsis*. *Molecular Plant* **7**, 528-540.

Jiang L, Liu X, Xiong G, Liu H, Chen F, Wang L, Meng X, Liu G, Yu H, Yuan Y, Yi W, Zhao L, Ma H, He Y, Wu Z, Melcher K, Qian Q, Xu HE, Wang Y, Li J. 2013. DWARF 53 acts as a repressor of strigolactone signalling in rice. *Nature* **504**, 401-405.

Joel DM, Back A, Kleifeld Y, Gepstein S. 1991. Seed conditioning and its role in *Orobanche* seed germination: inhibition by paclobutrazol. In: Wegmann K., Musselmann L.J. (eds.): Progress in *Orobanche* Research, Proceeding of the International Workshop on *Orobanche* Research, 19-22 August 1989, Obermarchtal FRG, 147-156.

Joel DM, Kleifeld Y, Losner-Goshen D, Herzlinger G, Gressel J. 1995 a. Transgenic crops against parasites. *Nature* **374,** 220-221.

Joel DM, Steffens JC, Matthews DE. 1995 b. Germination of weedy root parasites. In: Kigel J, Galili G, eds. *Seed development and germination*. New York: Marcel Dekker, Inc, 567–597.

Joel DM, Hershenhorn Y, Eizenberg H, Aly R, Ejeta G, Rich PJ, Ransom JK, Sauerborn J, and Rubiales D. 2006. Biology and Management of Weedy Root Parasites. *Horticultural Reviews John Wiley and Sons* **33**, 267-349.

Joel DM, Hershenhorn J, Eizenberg H, Aly R, Ejeta G, Rich PJ, Ransom JK, Sauerborn J, Rubiales D. 2007. Biology and management of weedy root parasites. *Horticultural Reviews* **33,** 267–349.

Joel DM, Bar H, Mayer AM, Plakhine D, Ziadne H, Westwood JH, Welbaum GE. 2011. Seed ultrastructure and water absorption pathway of the root-parasitic plant *Phelipanche aegyptiaca* (*Orobanchaceae*). *Annals of Botany* **109**, 181–195.

-K-

Kanai M, Nishimura M, Hayashi MA. 2010. A peroxisomal ABC transporter promotes seed germination by inducing pectin degradation under the control of *ABI5*. *The Plant Journal* **6**, *936–947.*

Kapulnik Y, Resnick N, Mayzlish-Gati E, Kaplan Y, Wininger S, Hershenhorn J, Koltai H. 2011. Strigolactones interact with ethylene and auxin in regulating root-hair elongation in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* **62**, 2915–2924.

Karssen CM, Zagorski S, Kepczynski J, and Groot SPC. 1989. Key role for endogenous gibberellins in the control of seed germination. *Annals of Botany* **63**, 71-80.

Kasasian L. 1971. *Orobanche* spp.. *Pest Artciles and News Summaries*, **17,** 35-41.

Kebreab E, Murdoch AJ. 1999. A quantitative model for loss of primary dormancy and induction of secondary dormancy in imbibed seeds of *Orobanche* spp. *Journal of Experimental Botany* **50**, 211–219.

Keyes WJ, O'Malley RC, Kim D, Lynn DG. 2000. Signaling organogenesis in parasitic angiosperms: xenognosin generation, perception, and response. *Jouranl of Plant Growth Regulation* **19**, 217-231.

Kiselev KV, Tyunin AP, Zhuravlev YN. 2013. Involvement of DNA methylation in the regulation of *STS10* gene expression in Vitis amurensis. *Planta* **237**: 933–941.

Kohlen W, Charnikhova T, Liu Q, Bours R, Domagalska MA, Beguerie S, Verstappen F, Leyser O, Bouwmeester HJ, Ruyter-spira C. 2011. Strigolactones are transported through the xylem and play a key role in shoot architectural response to phosphate deficiency in non-AM host *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* **155**, 974–987.

Kong X, Zhang M, Ding Z. 2014. D53 : the missing link in the strigolactone signaling. *Molecular plant* **7**, 761-763.

Koornneef M, Hanhart CJ, Hilhorst H, Karssen CM. 1989. ln vivo inhibition of seed development and reserve protein accumulation in recombinants of abscisic acid biosynthesis and responsiveness mutants in Arabidopsis thaliana. *Plant Physiology* **90**, 463-469.

Koornneef M, Bentsink L and Hilhorst H. 2002. Seed dormancy and germination. *Current Opinion in Plant Biology* **5**, 33 – 36.

Koukalova B, Fojtova M, Lim KY, Fulnecek J, Leitch AR, Kovarik A. 2005. Dedifferentiation of tobacco cells is associated with ribosomal RNA gene hypomethylation, increased transcription, and chromatin alterations. *Plant Physiology* **139**, 275–286.

Kretzschmar T, Kohlen W, Sasse J, Borghi L, Schlegel M, Bachelier JB, Reinhardt D, Bours R, Bouwmeester HJ, Martinoia E. 2012. A petunia ABC protein controls strigolactonedependent symbiotic signalling and branching. *Nature* **483,** 341–344.

Kucera B, Cohn MA, Leubner-Metzger G. 2005. Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination. Seed *Science Research* **15**, 281-307.

Kuijt J. 1977. Haustoria of phanerogamic parasites. *Annual review of phytopathology* **15**, 91–118.

Kushiro T, Okamoto M, Nakabayashi K, Yamagishi K, Kitamura S, Asami T, Hirai N, Koshiba T, Kamiya Y, Nambara E. 2004. The *Arabidopsis* cytochrome P450 CYP707A encodes ABA 8'-hydroxylases: key enzymes in ABA catabolism. *European Molecular Biology Organization Journal* **23,** 1647–1656.

-L-

Labrousse P, Arnaud MC, Serieys H, Berville A, Thalouarn P.2001. Several mechanisms are involved in resistance of *Helianthus* to *Orobanche cumana* Wallr. *Annals of Botany* **88**, 859*–868.*

Lang GA. 1996. Plant Dormancy:Physiology, biochemistry and molecular biology. *CAB International*, 408 pp., ISBN 085-198-97-80, Wallingford, UK.

Lauria M, Rupe M, Guo M, Kranz E, Pirona R, Viotti A, Lund G. 2004. Extensive Maternal DNA Hypomethylation in the Endosperm of *Zea mays*. *The Plant Cell* **16**, 510–522.

Lechat MM, Pouvreau JB, Peron T, Gauthier M, Montiel G, Veronesi C, Todoroki Y, Le Bizec B, Monteau F, Macherel D, **Simier P, Thoiron S, Delavault P.** 2012. *PrCYP707A1*, an ABA catabolic gene, is a key component of *Phelipanche ramosa* seed germination in response to the strigolactone analogue GR24. *Journal of Experimental Botany* **63**,5311–5322.

Law RD, Suttle JC. 2003. Transient decreases in methylation at 5’-cCGG-3’ sequences in potato (*Solanum tuberosum* L.) meristem DNA during progression of tubers through dormancy precede the resumption of sprout growth. *Plant Molecular Biology* **51**, 437–447.

Lee S, Cheng H, King KE, Wang W, He Y, Hussain A, Lo J, Harberd NP, Peng J. 2002. Gibberellin regulates *Arabidopsis* seed germination via RGL2, a GAI/RGA-like gene whose expression is up-regulated following imbibition. *Genes Dev* **16,** 646–658.

Leubner-Metzger G. 2001 Brassinosteroids and gibberellins promote tobacco seed germination by distinct pathways. *Planta* **213**, 758-763.

Leubner-Metzger G. 2002. Seed after-ripening and over-expression of class I beta-1,3-glucanase confer maternal effects on tobacco testa rupture and dormancy release. *Planta* **215**, 959-68.

Li QF, Wang C, Jiang L, Li S, Sun SS, and He JX. 2012. An interaction between BZR1 and DELLAs mediates direct signaling crosstalk between brassinosteroids and gibberellins in *Arabidopsis*. *Science Signaling* **5**, ra72.

Lin H, Wang R, Qian Q, Yan M, Meng X, Fu Z, Yan C, Jiang B, Su Z, Li J, Wang Y. 2009. DWARF27, an iron-containing protein required for the biosynthesis of strigolactones, regulates rice tiller bud outgrowth. *Plant Cell* **21**, 1512–1525.

Linke KH, Sauerborn J, Saxena MC. 1989. *Orobanche* field guide. *University of Hohenheim eds*., 42pp.

Liu PP, Montgomery TA, Fahlgren N, Kasschau KD, Nonogaki H, Carrington JC. 2007. Repression of AUXIN RESPONSE FACTOR10 by microRNA160 is critical for seed germination and post-germination stages. *Plant Journal* **52**, 133-146.

Liu Q, Zhang Y, Matusova R, Charnikhova T, Amini M, Jamil M, Fernandez-Aparicio M, Huang K, Timko MP, Westwood JH, Ruyter-Spira C, van der Krol S and Bouwmeester HJ. 2014. *Striga hermonthica* MAX2 restores branching but not the Very Low Fluence Response in the *Arabidopsis thaliana* max2 mutant. *New Phytologist* **202**, 531–541.

Liu Y, Shi L, Ye N, Liu R, Jia W, Zhang J. 2009. Nitric oxide-induced rapid decrease of abscisic acid concentration is required in breaking seed dormancy in *Arabidopsis*. *New Phytologist* **183**, 1030–1042.

Liu Y, Ye N, Liu R, Chen M, Zhang J. 2010. H_2O_2 mediates the regulation of ABA catabolism and GA biosynthesis in *Arabidopsis* seed dormancy and germination. *Journal of Experimental Botany* **61,** 2979–2990.

Long JA, Ohno C, Smith ZR, and Meyerowitz EM. 2006. TOPLESS regulates apical embryonic fate in Arabidopsis. *Science* **312-5779**, 1520-1523.

Losner-Goshen D, Portnoy VH, Mayer AM, Joel DM. 1998 Pectinolytic activity by the haustorium of parasitic Orobanche L. (Orobanchaceae) in host roots. *Annals of Botany* **81**, 319-326.

Lu G, Wu X, Chen B, Gao G, Xu K, Li X. 2006. Detection of DNA methylation changes during seed germination in rapeseed (*Brassica napus*). *Chinese Science Bulletin* **51**, 182–190.

-M-

Mangnus EM and Zwanenburg B. 1992. Synthesis, structural characterization, and biological evaluation of all four enantiomers of strigol analogue GR7. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **40**, 697-700.

Martienssen RA, Colot V. 2001. DNA methylation and epigenetic inheritance in plants and filamentous fungi. *Science* **293**, 1070–1074.

Mashiguchi K, Sasaki E, Shimada Y, Nagae M, Ueno K, Nakano T, Yoneyama K, Suzuki Y, Asami T. 2009. Feedback-regulation of strigolactone biosynthetic genes and strigolactone-regulated genes in Arabidopsis. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **73,** 2460–2465.

Matakiadis T, Alboresi A, Jikumaru Y, Tatematsu K, Pichon O, Renou J-P, Kamiya Y, Nambara E, Truong H-N. 2009. The Arabidopsis abscisic acid catabolic gene CYP707A2 plays a key role in nitrate control of seed dormancy. *Plant Physiology* **149,** 949–960.

Matusova R, Mourik T van, Bouwmeester HJ. 2004. Changes in the sensitivity of parasitic weed seeds to germination stimulants. *Seed Science Research* **14**, 335–344.

Matusova R, Rani K, Verstappen FW, Franssen MC, Beale MH, Bouwmeester H.J. 2005. The strigolactone germination stimulants of the plant-parasitic *Striga* and *Orobanche spp*. are derived from the carotenoid pathway. *Plant Physiology* **139**, 920-934.

McGinnis KM, Thomas SG, Soule JD, Strader LC, Zale JM, Sun Tp and Steber CM. 2003. The *Arabidopsis* SLEEPY1 (*SLY1*) gene encodes a putative F-box subunit of an SCF E3 ubiquitin ligase. *Plant Cell* **15**, 1120-1130.

Mesa-Garcia J, Giraldez JV, Garcia-Torres L. 1986. A study of the population dynamics and dispersal of crenata broomrape (*Orobanche crenata* Forsk.) in a broadbean (*Vicia faba* L.) field. In: Proceedings of the Workshop on biology and control of *Orobanche*, Wageningen. *The Netherlands*, 114-117.

Meurs C, Basra AS, Karssen CM, van Loon LC. 1992. Role of abscisic acid in induction of desiccation tolerance in developing seeds of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* **98**, 1484-1493.

Meng F, Li Y, Yin J, Liu H, Chen X, Ni Z, Sun Q. 2012. Analysis of DNA methylation during the germination of wheat seeds. *Biologia Plantarum* **56**, 269–275.

Millar AA, Jacobsen JV, Ross JJ, Helliwell CA, Poole AT, Scofield G, Reid JB, Gubler F. 2006. Seed dormancy and ABA metabolism in *Arabidopsis* and barley: the role of ABA 8'-hydroxylase. *The Plant Journal* **45,** 942–954.

Mitchum MG, Yamaguchi S, Hanada A, Kuwahara A, Yoshioka Y, Kato T, Tabata S, Kamiya Y, Sun TP. 2006. Distinct and overlapping roles of two gibberellin 3-oxidases in *Arabidopsis* development. *Plant Journal* **45**, 804-818.

Mönke G, Seifert M, Keilwagen J, Mohr M, Grosse I, Hähnel U, Junker A, Weisshaar B, Conrad U, Bäumlei,; Altschmied L. 2012. Toward the identification and regulation of the *Arabidopsis thaliana ABI3* regulon. *Nucleic Acids Research* **40**(17), 8240-8254.

Muller K, Tintelnot S, Leubner-Metzger G. 2006. Endosperm-limited Brassicaceae seed germination: abscisic acid inhibits embryo-induced endosperm weakening of *Lepidium sativum* (cress) and endosperm rupture of cress and *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* **47**, 864-877.

Müller M, Munné-Bosch S. 2011. Rapid and sensitive hormonal profiling of complex plant samples by liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Plant Methods* **7,** 37.

Müller K, Bouyer D, Schnittger A, Kermode AR. 2012. Evolutionarily conserved histone methylation dynamics during seed life-cycle transitions. *PloS one* **7**: e51532.

Murdoch AJ, and Ellis RH. 2000. Dormancy, viability and longevity. I, Fenner M. (ed.), Seeds: The Ecology of Regeneration and Plant Communities, 2nd edition, pp. 183-214 Wallingford: CAB International.

Murdoch AJ, Kebreab E. 2013. Germination Ecophysiology - Parasitic Orobanchaceae, pp. 195-219.

Murgia I, de Pinto MC, Delledonne M, Soave C, De Gara L. 2004. Comparative effects of various nitric oxide donors on ferritin regulation, programmed cell death, and cell redox state in plant cells. *Journal of Plant Physiology* **161**(7), 777-83.

Musselmann LJ. 1980. The biology of *Striga*, *Orobanche*, and other root-parasitic weeds. *Annual Review of Phytopathology* **18**, 463-489.

-N-

Nakamura H, Xue YL, Miyakawa T, Hou F, Qin HM, Fukui K, Shi X, Ito E, Ito S, Park SH, Miyauchi Y, Asano A, Totsuka N, Ueda T, Tanokura M, Asami T. 2013. Molecular mechanism of strigolactone perception by DWARF14. *Nature Communications* **4**, 2613.

Nambara E, Akazawa T, and McCourt P. 1991. Effects of the gibberellin biosynthetic inhibitor uniconazol on mutants of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **97**, 736-738.

Nambara E, Marion-Poll A. 2003. ABA action and interactions in seeds. *Trends in Plant Science* **8**, 213-217.

Nambara E, Marion-Poll A. 2005. Abscisic acid biosynthesis and catabolism. *Annual Review of Plant Biology* **56,** 165–185.

Nelson DC, Riseborough JA, Flematti GR, Stevens J, Ghisalberti EL, Dixon KW, Smith SM. 2009. Karrikins *discovered in* smoke trigger Arabidopsis seed germination by a mechanism requiring gibberellic acid synthesis and light. *Plant Physiology* **149,** 863–873.

Nelson DC, Flematti GR, Riseborough J-A, Ghisalberti EL, Dixon KW, Smith SM. 2010. Karrikins enhance light responses during germination and seedling development in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **107,** 7095–7100.

Nelson DC, Scaffidi A, Dun EA, Waters MT, Flematti GR, Dixon KW, Beveridge CA, Ghisalberti EL, Smith SM. 2011. F-box protein MAX2 has dual roles in karrikin and strigolactone signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA* **108**, 8897–890.

Nelson DC, Caitlin EC, Neumann D, Dayer KA. 2013. An investigation of the genetic basis for strigolactone perception in parasitic plant germination. *12th World Congress on Parasitics Plants*, Sheffield UK.

Nickrent DL, Duff RJ, Colwell AE, Wolfe AD, Young ND, Steiner KE, dePamphilis CW. 1998. Molecular Phylogenetic and Evolutionary Studies of Parasitic Plants. In: *Soltis DE, Soltis PS, Doyle JJ, eds. Molecular Systematics of Plants II. Springer US*, 211–241.

Nonogaki H, and Morohashi Y. 1996. An Endo-beta-Mannanase Develops Exclusively in the Micropylar Endosperm of Tomato Seeds Prior to Radicle Emergence. *Plant Physiol* **110**, 555-559.

Nonogaki H. 2014. Seed dormancy and germination-emerging mechanisms and new hypotheses. *Frontiers in plant science* **5**: 233.

-O-

Oh E, Yamaguchi S, Kamiya Y, Bae G, Chung WI, Choi G. 2006. Light activates the degradation of PIL5 protein to promote seed germination through gibberellin in *Arabidopsis*. *Plant Journal* **47**, 124-139.

Oh E, Yamaguchi S, Hu J, Yusuke J, Jung B, Paik I, Lee H-S, Sun T-P, Kamiya Y, Choi G. 2007. PIL5, a phytochrome-interacting BHLH protein, regulates gibberellin responsiveness by binding directly to the *GAI* and *RGA* promoters in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **19**, 1192-1208.

Okamoto M, Kuwahara A, Seo M, Kushiro T, Asami T, Hirai N, Kamiya Y, Koshiba T, Nambara E. 2006. CYP707A1 and CYP707A2, which encode abscisic acid 8'-hydroxylases, are indispensable for proper control of seed dormancy and germination in Arabidopsis. *Plant Physiology* **141,** 97–107.

Okazaki M, Kittikorn M, Ueno K, Mizutani M, Hirai N, Kondo S, Ohnishi T, Todoroki Y. 2012. Abscinazole-E2B, a practical and selective inhibitor of ABA 8'-hydroxylase CYP707A. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **20,** 3162–3172.

Olmstead RG, Wolfe AD, Young ND, Elisons WJ, Reeves PA. 2001. Disintegration of the *Scrophulariaceae*. *American Journal of Botany* **88**, 348–361.

Ortega-Galisteo AP, Morales-Ruiz T, Ariza RR, Roldán-Arjona T. 2008. Arabidopsis DEMETER-LIKE proteins DML2 and DML3 are required for appropriate distribution of DNA methylation marks. *Plant Molecular Biology* **67**: 671–681.

Ozenda P, Capdebon M. 1979. L'appareil haustorial des phanerogames parasites (1ère et 2ème parties). *Revue Générale de Botanique* **86**, 235–343.

-P-

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

Parker C. 2009. Observations on the current status of *Orobanche* and *Striga* problems worldwide. *Pest Management Science* **65**, 453–459.

Penfield S, Rylott EL, Gilday AD, Graham S, Larson TR, Graham IA. 2004. Reserve mobilization in the *Arabidopsis* endosperm fuels hypocotyl elongation in the dark, is independent of abscisic acid, and requires PHOSPHOENOLPYRUVATE CARBOXYKINASE1. *Plant Cell* **16,** 2705-2718.

Penfield S, Josse EM, Kannangara R, Gilday AD, Halliday KJ, Graham IA. 2005. Cold and light control seed germination through the bHLH transcription factor SPATULA. *Current Biology* **15**, 1998–2006.

Penfield S and Hall A. 2009. A Role for Multiple Circadian Clock Genes in the Response to Signals That Break Seed Dormancy in *Arabidopsis. Plant Cell* **21**(6), 1722–1732.

Perez-de-Luque A, Galindo JC, Macias FA, Jorrin J. 2000. Sunflower sesquiterpene lactone models induce *Orobanche cumana* seed germination. *Phytochemistry* **53**, 45–50.

Pieterse AH. 1979. The broomrapes (*Orobanchaceae*) – a review. *Abstract on Tropical Agriculture*, **5**, 9-35.

Péron. 2010. Caractérisation moléculaire et régulation de la force de puits de la plante parasite *Phelipanche ramosa* (L.) Pomel vis-àvis du saccharose prélevé chez son hôte. Thèse de doctorat. Université de Nantes, Nantes.

Péron T, Véronési C, Mortreau E, Pouvreau J-B, Thoiron S, Leduc N, Delavault P, Simier P. 2012. Role of the sucrose synthase encoding *PrSus1* gene in the development of the parasitic plant *Phelipanche ramosa* L. (Pomel). *Molecular Plant–Microbe Interactions* **25,** 402–411.

Pieterse AH, Verkleij JAC. 1994. Germination ecology of *Striga* and *Orobanche*. An overview. In: Pieterse AH, Verkleij JAC, ter Borg SJ, eds. Biology and Management of Orobanche, Proceedings of the Third International Workshop on *Orobanche* and Related *Striga* Research. Amsterdam: Royal Tropical Institute, 36-48.

Plakhine D, Ziadna H, Joel DM. 2009. Is seed conditioning essential for *Orobanche* germination? *Pest Management Science* **65,** 492–496.

Plakhine D, Tadmor Y, Ziadne H, Joel DM. 2012. Maternal tissue is involved in stimulant reception by seeds of the parasitic plant *Orobanche*. *Annals of Botany* **109**, 979–986.

Plaza L, Fernandez I, Juan R, Pastor J, Pujadas A. 2004. Micromorphological studies on seeds of orobanche species from the iberian peninsula and the balearic islands, and their systematic significance. *Ann Bot* **94**, 167-178.

Portis E, Acquadro A, Comino C, Lanteri S. 2004. Analysis of DNA methylation during germination of pepper (*Capsicum annuum* L.) seeds using methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP). *Plant Science* **166**, 169–178.

Pouvreau JB, Gaudin Z, Auger B, Lechat MM, Guthier M, Delavault P, Simier P. 2013. A high-throughput seed germination assay for root parasitic plants. *Plant methods* **9**, 32.

Prider J. Craig A, Matthews J, Correll R. 2012. Natural seed bank decline of *Phelipanche ramosa mutelii* in south Australia. 12th Wporld Congress on Parasitic Plants, Sheiffield, UK.

Probert RJ. 2000. The Role of Temperature in the Regulation of Seed Dormancy and Germination. Seeds: The Ecology of Regeneration in Plant Communities, 2nd edition.

-Q-

Qasem JR. 2006. Recent advances in parasitic weed research: an overview., 627–769.

-R-

Ramachandra K. Reddy, Sarita Chaudhary 1, Prashant Patil, Priti Krishna. 1998. The 90 kDa heat shock protein (hsp90) is expressed throughout *Brassica napus* seed development and germination. *Plant Science* **131**, 131-137

Rasmussen A, Mason MG, De Cuyper C, Brewer PB, Herold S, Agusti J, Geelen D, Greb T, Goormachtig S, Beeckman T, Beveridge CA. 2012. Strigolactones suppress adventitious rooting in Arabidopsis and pea. *Plant Physiology* **158**, 1976–1987.

Raynal-Roques A, Paré J (1998) Biodiversité des Phanérogames parasites : leur place dans la classification systématique. *Adansonia* **20**, 313-322

Raz V, Bergervoet J, and Koornneef M. 2001. Sequential steps for developmental arrest in *Arabidopsis* seeds. *Development* **128,** 243–*252.*

Reddington JP, Pennings S, Meehan RR. 2013. Non-canonical functions of the DNA methylome in gene regulation. *Biochemical Journal* **451**, 13–23.

Richards EJ. 1997. DNA methylation and plant development. *Trends in genetics: TIG* **13**: 319–323.

Riopel JL, Timko MP. 1995. Haustorial initiation and differentiation. In: Press MC, Graves JD 436 (eds) Parasitic plants. Chapman and Hall, London, pp 39–79.

Rodríguez-Gacio MDL, Matilla-Vázquez MA, and Matilla AJ. 2009. Seed dormancy and ABA signaling. *Plant signal behavior* **4**(11), 1035-1048.

Roldan-Arjona T, Ariza RR. 2009. DNA demethylation. In: Grosjean H, ed. DNA and RNA Modification Enzymes: Comparative Structure, Mechanism, Function, Cellular Interactions and Evolution. Landes Bioscience, Austin, TX, 149-161

Ruyter-Spira C, Kohlen W, Charnikhova T, van Zeijl A, van Bezouwen L, de Ruijter N, Cardoso C, Lopez-Raez JA, Matusova R, Bours R, Verstappen F, Bouwmeester H. 2011. Physiological effects of the synthetic strigolactone analog GR24 on root system architecture in *Arabidopsis*: another belowground role for strigolactones? *Plant Physiology* **155**, 721-34.

Ruyter-Spira C, Al-Babili S, van der Krol S, Bouwmeester HJ. 2013. The biology of strigolactones. *Trends in Plant Science* **18**, 72–83.

-S-

Saghir AR. 1986. Dormancy and germination of Orobance seeds in relation to control methods. Proceedings of a workshop on Biology and control of Orobanche (ed. S.J. ter Borg), pp. 25-34. Wageningen, The Netherlands.

Saito S, Hirai N, Matsumoto C, Ohigashi H, Ohta D, Sakata K, Mizutani M. 2004. *Arabidopsis CYP707A*s encode (+)-abscisic acid 8'-hydroxylase, a key enzyme in the oxidative catabolism of abscisic acid. *Plant Physiology* **134,** 1439–1449.

Saito S, Okamoto M, Shinoda S, Kushiro T, Koshiba T, Kamiya Y, Hirai N, Todoroki Y, Sakata K, Nambara E, Mizutni M. 2006. A plant growth retardant, uniconazole, is a potent inhibitor of ABA catabolism in *Arabidopsis*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **70,** 1731–1739.

Schneeweiss GM, Colwell A, Park JM, Jang CG, Stuessy TF. 2004. Phylogeny of holoparasitic *Orobanche* (*Orobanchaceae*) inferred from nuclear ITS sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **30**, 465–478.

Scholes JD, Press MC. 2008. Striga infestation of cereal crops - an unsolved problem in resource limited agriculture. *Current Opinion in Plant Biology* **11**, 180-186.

Schulte TW, Akinaga S, Murakata T, Agatsuma T, Sugimoto , Nakano H, Lee YS, Simen BB, Argon Y, Felts S, Toft DO, Neckers LM, and Sharma SV. 1999. Interaction of Radicicol with Members of the Heat Shock Protein 90 Family of Molecular Chaperones. *Molecular endocrinology* **13,** 1944-9917.

Seel WE, Jeschke WD.1999. Simultaneous collection of xylem sap from *Rhinanthus minor* and the hosts Hordeum and Trifolium: hydraulic properties, xylem sap composition and effects of attachment. *New Phytologist* **143,** 281*–298.*

Seo M, Hanada A, Kuwahara A, Endo A, Okamoto M, Yamauchi Y, North H, Marion-Poll A, Sun TP, Koshiba T, Kamiya Y, Yamaguhi S, Nambara E. 2006. Regulation of hormone metabolism in *Arabidopsis* seeds: phytochrome regulation of abscisic acid metabolism and abscisic acid regulation of gibberellin metabolism. *The Plant Journal* **48,** 354–366.

Sharma AD, Singh P. 2003. Evidence for the role of FK506-inhibitable peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerase activity in seed germination. *Current Science* **84,** 142–143.

Singh M, Singh DV, Misra PC, Tewari KK, Krishnan PS. 1968. Biochemical aspects of parasitism by angiosperm parasites: starch accumulation. *Physiologia Plantarum* **21**, 525-538.

Söderman E, Brocard I, Lynch T, and Finkelstein R. 2000. Regulation and function of the Arabidopsis ABA-insensitive4 (ABI4) gene in seed and ABA response signaling networks. *Plant Physiology* **124,** 1752*–1765.*

Song WJ, Zhou WJ, Jin ZL, Cao DD, Joel DM, Takeuchi Y, Yoneyama K. 2005. Germination response of *Orobanche* seeds subjected to conditioning temperature, water potential and growth regulator treatments. *Weed Research* **45**, 467-476.

Srivastava N., Vijay K., Gonugunta - Mallikarjuna R.P., Agepati Raghavendra S. 2009 Nitric oxide production occurs downstream of reactive oxygen species in guard cells during stomatal closure induced by chitosan in abaxial epidermis of *Pisum sativum*. *Planta* **229**, 757–765.

Stanga JP, Smith SM, Briggs WR, and Nelson DC. 2013. SUPPRESSOR OF MORE AXILLARY GROWTH2 1 controls seed germination and seedling development in Arabidopsis. *Plant Physiology* **163**,318-330.

Steffens JC, Lynn DG, Kamat VS, Riopel JL. 1982. Molecular specificity of haustorial induction in *Agalinis purpurea* (L.) Raf. (Scrophulariaceae). Annals Botany **50**, 1-7.

Stirnberg P, van de Sande K, Leyser O. 2002. MAX1 and MAX2 control shoot lateral branching in Arabidopsis. *Development* **129**, 1131–1141.

Stirnberg P, Furner IJ and Leyser HMO. 2007. MAX2 participates in an SCF complex wich acts locally at the node to suppress shoot branching. *Plant Journal* **50-1**, 80-94.

Szemenyei H, Hannon M, Long JA. 2008 TOPLESS mediates auxin-dependent transcriptional repression during Arabidopsis embryogenesis. *Science* **319**, 1384–1386.

-T-

Takagi K, Okazawa A, Wada Y, Mongkolchaipyaphruek A, Fukusaki E, Yoneyama K, Takeuchi Y, Kobayashi A. 2009. Unique phytochrome responses of the holoparasitc plant Orobanche minor. *New Phytologist* **182**: 965-974.

Thomas SG, Rieu I, Steber CM. 2005. Gibberellin metabolism and signaling. *Vitamins and Hormones* **72**, 289-338.

Thorogood CJ, Rumsey FJ and Hiscock SJ. 2009. Host-specific races in the holoparasitic angiosperm *Orobanche minor*: implications for speciation in parasitic plants. *Annals of botany* **103**, 1005-1014.

Toft CA and Karter AJ. 1990. Parasite-host coevolution. *Trends in Ecology and Evolution* **5**, 326-9.

Toh S, Kamiya Y, Kawakami N, Nambara E, McCourt P, Tsuchiya Y. 2012. Thermoinhibition uncovers a role for strigolactones in *Arabidopsis* seed germination. *Plant Cell Physiol* **53**, 107–117.

Trap-Gentil M-V, Hébrard C, Lafon-Placette C, Delaunay A, Hagège D, Joseph C, Brignolas F, Lefebvre M, Barnes S, Maury S. 2011. Time course and amplitude of DNA methylation in the shoot apical meristem are critical points for bolting induction in sugar beet and bolting tolerance between genotypes. *Journal of experimental botany* **62**, 2585–2597.

Tsuchiya Y, Vidaurre D, Toh S, Hanada A, Nambara E, Kamiya Y, Yamaguchi S, McCourt P. 2010. A small-molecule screen identifies new functions for the plant hormone strigolactone. *Nat Chem Biol* **6**,741–749.

Tyler L, Thomas SG, Hu J, Dill A, Alonso JM, Ecker JR, Sun T-p. 2004. DELLA proteins and gibberellin-regulated seed germination and floral development in Arabidopsis. *Plant Physiology* **135**, 1008–1019.

-U-

Ueguchi-Tanaka M, Nakajima M, Katoh E, Ohmiya H, Asano K, Saji S, Hongyu X, Ashikari M, Kitano H, Yamaguchi I, and Matsuoka M. 2007. Molecular interactions of a soluble gibberellin receptor, GID1, with a rice DELLA protein, SLR1, and gibberellin. *Plant Cell* **19,** 2140*–2155.*

Uematsu K, Nakajima M, Yamaguchi I, Yoneyama K, Fukui Y. 2007. Role of cAMP in gibberellin promotion of seed germination in *Orobanche* minor Smith. *Journal of Plant Growth Regulation* **26,** 245–254.

Umehara M, Hanada A, Yoshida S, Akiyama K, Arite T, Takeda-Kamiya N, Magome H, Kamiya Y, Shirasu K, Yoneyama K, Bouwmeester H, Bécard G, Beveridge CA, Rameau C, Rochange SF. 2008. Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones. *Nature* **455**, 195–200.

-V-

Van Zanten M, Liu Y, Soppe WJJ. 2013. Epigenetic Signalling During the Life of Seeds. In: Grafi G, Ohad N, eds. *Signaling and Communication in Plants. Epigenetic Memory and Control in Plants*. Springer Berlin Heidelberg, 127–153.

Vanyushin BF. 2006. DNA methylation in plants. *Current topics in microbiology and immunology* **301**: 67–122.

Veronesi C, Bonnin E, Calvez S, Thalouarn P, Simier P. 2007. Activity of secreted cell wall-modifying enzymes and expression of peroxidase-encoding gene following germination of *Orobanche ramosa*. *Biologia Plantarum* **51**, 391-394.

Vert G, and Chory, J. 2006. Downstream nuclear events in brassinosteroid signalling. *Nature* **441**, 96–10.

Vieira Dos Santos C, Letousey P, Delavault P, Thalouarn P. 2003. Defense Gene Expression Analysis of *Arabidopsis thaliana* Parasitized by *Orobanche ramosa*. *Phytopathology* **93**, 451–457.

Vleeshouwers LM, Bouwmeester HJ and Karssen CM. 1995. Redefining seed dormancy: an attempt to integrate physiology and ecology. *Journal of Ecology* **83**, 1031-1037.

Vuylsteke M, Peleman JD, van Eijk MJT. 2007. AFLP-based transcript profiling (cDNA-AFLP) for genome-wide expression analysis. *Nature Protocols* **2,** 1399–1413.

-W-

Waldie T, McCulloch H, and Leyser O. 2013. Strigolactones and the control of plant development: Lessons from shoot branching. *The plant journal* DOI: 10.1111/tpj.12488.

Wang Y, Sun S, Zhu W, Jia K, Yang H, and Wang X. 2013. Strigolactone/MAX2-Induced Degradation of Brassinosteroid Transcriptional Effector BES1 Regulates Shoot Branching. *Developmental Cell* **27**, 681-688.

Wang Z, Meng D, Wang A, Li T, Jiang S, Cong P, Li T. 2013a. The methylation of the *PcMYB10* promoter is associated with green-skinned sport in Max Red Bartlett pear. *Plant Physiology* **162**, 885–896.

Wang Z, Cao H, Sun Y, Li X, Chen F, Carles A, Li Y, Ding M, Zhang C, Deng X, Soppe WJJ, Liu YX. 2013b. Arabidopsis paired amphipathic helix proteins SNL1 and SNL2 redundantly regulate primary dormancy via abscisic acid-ethylene antagonism mediated by histone deacetylation. *The Plant Cell* **25**, 149-166.

Wareing PF and Saunders PF. 1971. Hormones and dormancy. *Annual review of Plant Physiology* **22**, 261-288.

Watt F, Molloy PL. 1988. Cytosine methylation prevents binding to DNA of a HeLa cell transcription factor required for optimal expression of the adenovirus major late promoter. *Genes and Development* **2**, 1136–1143.

Waters T, Nelsn DC, Scaffidi A, Flematti GR, Sun YK, Dixon KW and Smith SM. 2012. Specialisation within the DWARF14 protein family conferts responses to Karrikin and strigolactones in *Arabidopsis*. *Development* **139-7**, 1285-95.

Waters T, Scaffidi A, Flematti GR, Smith SM. 2013. The origins and mechanisms of karrikin signaling. *Current Opinion in Plant Biology* **16**, 667-673.

Waters MT, Scaffidi A, Sun YK, Flematti GR and Smith SM. 2014. The karrikin response system of Arabidopsis. *The Plant Journal* **79**, 623-631.

Weng Y-I, Huang TH-M, Yan PS. 2009. Methylated DNA immunoprecipitation and microarray-based analysis: detection of DNA methylation in breast cancer cell lines. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* **590**, 165–176.

Westwood JH, Yoder JI, Timko MP, dePamphilis CW. 2010. The evolution of parasitism in plants. *Trends in Plant Science* **15**, 227–235.

Westwood JH, dePamphilis CW, Das M, Fernandez-Aparicio M, Honaas LA, Timko MP, Wickett NJ, Yoder JI. 2011. The Parasitic Plant Genome Project: new tools for understanding the biology of *Orobanche* and *Striga*. *Weed Science* **60**(2), 295-306

Wolny E, Braszewska-Zalewska A, Hasterok R. 2014. Spatial distribution of epigenetic modifications in *Brachypodium distachyon* embryos during seed maturation and germination. *PloS One* **9**, e101246.

-X-

Xie X, Yoneyama K, Yoneyama K. 2010. The strigolactone story. *Phytopathology* **48**, 93.

-Y-

Yamaguchi S. 2008. Gibberellin metabolism and its regulation. *Annual Review of Plant Biology* **59**, 225–251.

Yamauchi Y, Ogawa M, Kuwahara A, Hanada A, Kamiya Y, and Yamaguchi S. 2004. Activation of gibberellin biosynthesis and response pathways by low temperature during imbibition of *Arabidopsis thaliana* seeds. *Plant Cell* **16**, 367-78.

Yin Y, Wang ZY, Mora-Garcia S, Li J, Yoshida S, Asami T, and Chory J. 2002. BES1 accumulates in the nucleus in response to brassinosteroids to regulate gene expression and promote stem elongation. *Cell* **109**, 181-191.

Yoder JA, Walsh CP, Bestor TH. 1997. Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends in Genetics* **13**, 335–340.

Yoneyama K, Takeuchi Y, Ogasawara M, Konnai M, Sugimoto Y, and Sassa T. 1998. Cotylenins and fusicoccins stimulate seed germination of *Striga hermonthica* (Del.) Benth and *Orobanche minor* Smith. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46**, 1583-1586.

Yoneyama K, Awad AA, Xie XN, Yoneyama K, Takeuchi Y. 2010. Strigolactones as germination stimulants for root parasitic plants. *Plant Cell Physiology* **51**, 1095–1103.

Yoshida S, Shirasu K. 2012. Plants that attack plants: molecular elucidation of plant parasitism. *Current opinion in plant biology* **15**: 708–713.

-Z-

Zehhar N, Ingouff M, Bouya D and Fer A. 2002. Possible involvement of gibberellins and ethylene in *Orobanche ramosa* germination. *Weed research* **46**, 464-469.

Zemach A, McDaniel IE, Silva P, Zilberman D. 2010. Genome-Wide Evolutionary Analysis of Eukaryotic DNA Methylation. *Science* **328**, 916–919.

Zhang H, Ogas J. 2009. An Epigenetic Perspective on Developmental Regulation of Seed Genes. *Molecular Plant* **2,** 610–627.

Zheng Z, de Saint Germain A, Chory J. 2014 Unfolding the mysteries of strigolactone signaling. *Molecular plant* **7**, 934-936.

Zhong S, Fei Z, Chen Y-R, Zheng Y, Huang M, Vrebalov J, McQuinn R, Gapper N, Liu B, Xiang J, 2013. Single-base resolution methylomes of tomato fruit development reveal epigenome modifications associated with ripening. *Nature Biotechnology* **31**, 154–159.

Zhou F, Lin Q, Zhu L, Ren Y, Zhou K, Shabek N, Wu F, Mao H, Dong W, Gan L, Ma W, Gao H, Chen J, Yang C, Wang D, Tan J, Zhang X, Guo X, Wang J, Jiang L, Liu X, Chen W, Chu J, Yan C, Ueno K, Ito S, Asami T, Cheng Z, Wang J, Lei C, Zhai H, Wu C, Wang H, Zheng N, Wan J. 2013. D14-SCFD3-dependent degradation of D53 regulates strigolactone signalling. *Nature* **504**, 406-410.

Zluvova J, Janousek B, Vyskot B. 2001. Immunohistochemical study of DNA methylation dynamics during plant development. *Journal of experimental botany* **52**, 2265–2273.

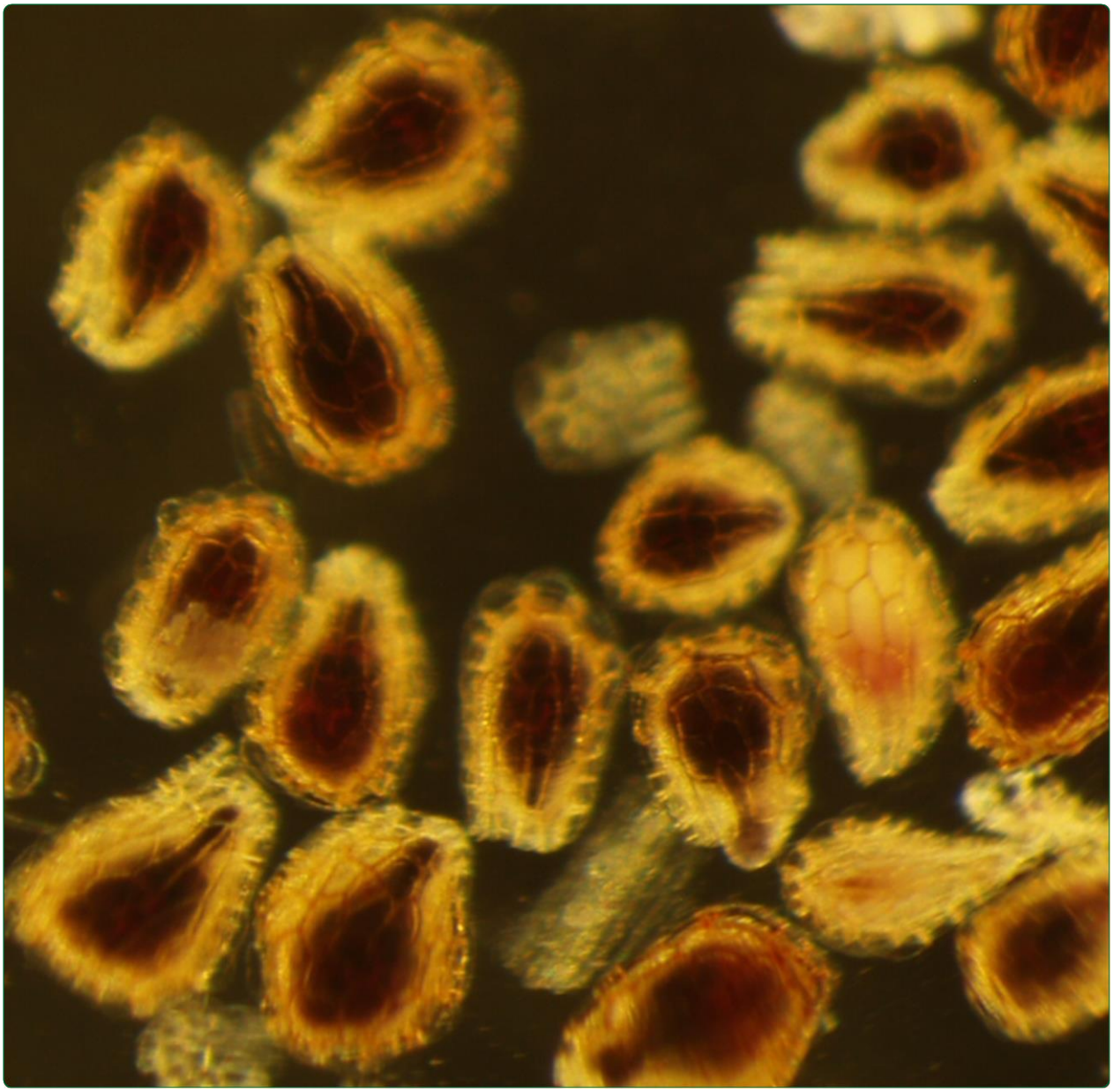
Zwanenburg B, Mwakaboko AS, Reizelman A, Anilkumar G, Sethumadhavan D. 2009. Structure and function of natural and synthetic signalling molecules in parasitic weed germination. *Pest Management Science* **65,** 478–491.

Annexes

Annexes 1

Article publié : A high-throughput seed germination assay for root parasitic plants

PLANT METHODS



A high-throughput seed germination assay for root parasitic plants

Pouvreau et al.

BioMed Central

Pouvreau et al. Plant Methods 2013, 9:32
http://www.plantmethods.com/content/9/1/32

Pouvreau et al. Plant Methods 2013, 9:32
http://www.plantmethods.com/content/9/1/32

PLANT METHODS

METHODOLOGY Open Access

A high-throughput seed germination assay for root parasitic plants

Jean-Bernard Pouvreau*†, Zachary Gaudin†, Bathilde Auger, Marc-Marie Lechat, Mathieu Gauthier, Philippe Delavault and Philippe Simier

Abstract

Background: Some root-parasitic plants belonging to the *Orobanche*, *Phelipanche* or *Striga* genus represent one of the most destructive and intractable weed problems to agricultural production in both developed and developing countries. Compared with most of the other weeds, parasitic weeds are difficult to control by conventional methods because of their life style. The main difficulties that currently limit the development of successful control methods are the ability of the parasite to produce a tremendous number of tiny seeds that may remain viable in the soil for more than 15 years. Seed germination requires induction by stimulants present in root exudates of host plants. Researches performed on these minute seeds are until now tedious and time-consuming because germination rate is usually evaluated in Petri-dish by counting germinated seeds under a binocular microscope.

Results: We developed an easy and fast method for germination rate determination based on a standardized 96well plate test coupled with spectrophotometric reading of tetrazolium salt (MTT) reduction. We adapted the Mosmann's protocol for cell cultures to germinating seeds and determined the conditions of seed stimulation and germination, MTT staining and formazan salt solubilization required to obtain a linear relationship between absorbance and germination rate. Dose–response analyses were presented as applications of interest for assessing half maximal effective or inhibitory concentrations of germination stimulants (strigolactones) or inhibitors (ABA), respectively, using four parameter logistic curves.

Conclusion: The developed MTT system is simple and accurate. It yields reproducible results for germination bioassays of parasitic plant seeds. This method is adapted to high-throughput screenings of allelochemicals (stimulants, inhibitors) or biological extracts on parasitic plant seed germination, and strengthens the investigations of distinctive features of parasitic plant germination.

Keywords: Broomrape, Germination, MTT, Parasitic plants, *Phelipanche ramosa*, Strigolactone

Background

Most of the root parasitic plants grow in natural habitats in equilibrium with their host plants all-over the world. In contrast, few species adapted to a different way of living as weeds in human-made ecosystems, and cause severe damage in major crops, such as some *Orobanche* and *Phelipanche* species (broomrapes) in the Mediterranean basin in addition to some *Striga* species in Africa and Asia [1]. Control of these root parasitic weeds is difficult and an integrated crop management is recommended to reduce the infestations using a rational combination of cultural, chemical, biological and genetic methods of control [2]. However, a biological trait of this kind of weeds make complex any crop management: each plant can produce an important amount of tiny seeds showing long viability in the soil.

Seed germination is a key component of pathogenicity of obligate parasitic weeds. This step is controlled allelochemically in the rhizosphere. After a short conditioning period under sufficient warm and wet conditions, seed germination is triggered by stimulant molecules which are released by the roots of neighboring host plants. Many secondary metabolites were identified as germination stimulants. Most of them corresponds to strigolactones (SLs) [3] but isothiocyanates [4,5], dehydrocostus lactone [6], peagol, peagoldione [7],

* Correspondence: Jean-Bernard.Pouvreau@univ-nantes.fr
† Equal contributors
Laboratoire de Biologie et de Pathologie Végétales EA 1157, SFR 4207 QUASAV, Nantes University, 44322 Nantes, France

BioMed Central

© 2013 Pouvreau et al.; licensee BioMed Central Ltd. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/2.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

chalcones, peapolyphenols [8], soyasapogenol B and trans-22-dehydrocampesterol [9] have been also identified as stimulants. It was recently demonstrated that seeds of *P. ramosa* needs a minimal period of conditioning before that stimulant GR24 (a synthetic SL) could trigger germination by breaking ABA dormancy [10]. Inversely, broomrape seed germination can be prevented in the rhizosphere by inhibitors including trigoxazonane present in root exudates of the allelopathic plant Trigonella [11], several trichotecenes produced by the potential biocontrol fungi agents, Myrothecium verrucaria and Fusarium compactum [12], 7-hydroxylated simple coumarins and both naringenin and gallic acid present in root exudates of resistant sunflower and pea, respectively [13-15]. In this context, many investigations are conducted on the identification and the characterization of the germination stimulants (e.g. [16-18]). Fundamentally, their interest corresponds to a better understanding of the plant-plant interaction. There is also a great agronomical challenge to control these parasitic weeds, either by preventing seed germination through biocontrol agents or intercropping with allelopathic plants, or in contrast by promoting seed germination in the absence of host plants by cropping false hosts in order to reduce the seed bank of the soils [2].

All these works need a rapid and reliable bioassay of seed germination allowing a high-throughput screening of molecules, root exudates or plant extracts. Until now, germination rate is usually evaluated in Petri-dish by counting germinated seeds under a binocular microscope. This method is time-consuming, tedious due to the minute size of seeds (about 200 μm in diameter, Figure 1), and inappropriate if hundreds of samples have to be analyzed. A miniaturization assay in 96-well plates is available for the screening of numerous Arabidopsis seedling accessions towards *P. ramosa* and *P. aegyptiaca* seed germination, and uses 10–50 seeds in water per well in which seedlings are transferred [19]. This method remains tedious notably due to the germination rate determination by binocular microscopy. We propose in this paper to substitute this step by a spectrophotometric determination of germination rate. Indeed to make easier and faster measurements for high-throughput studies, we developed a standardized 96-wells plate germination test coupled with spectrophotometric reading of methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (MTT) reduction [20]. The analog staining method using the tetrazolium salt 2,3,5 triphenyl tetrazolium chloride (TTC) demonstrated early changes in metabolic activity in *O. crenata* and *P. ramosa* seeds during germination [21,22]. Indeed TTC staining of seeds stimulated with GR24 for 5 min displayed an increase in metabolic activity 30 h after the stimulation. The radicle was observed after 40 h in seeds and germination was achieved 3 days after treatment (root protrusion) [21]. The tetrazolium salt systems are a mean of measuring the activity of living cells thanks to mitochondrial dehydrogenase activities [20]. The proposed MTT method is simple and accurate, and yields reproducible results. We demonstrate here that the MTT method can be adapted for high-throughput germination bioassays, then giving an efficient tool for detailed investigations on seed germination, as presented for example in this paper as a proof of concept with data on the effects of ABA level on *P. ramosa* seed germination.

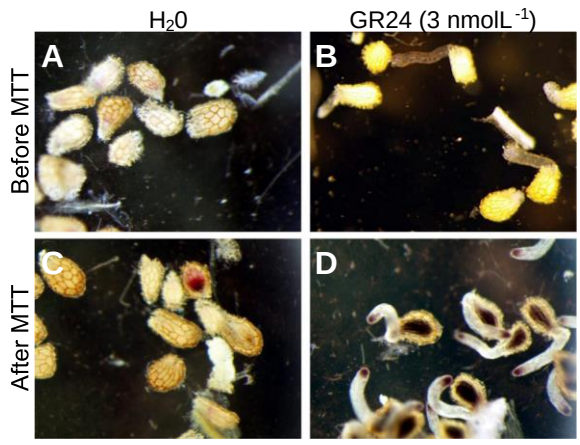


Figure 1 Reduction of MTT by conditioned and germinated seeds of *P. ramosa*. Control, conditioned seeds incubated without GR24 (A, C) and assays 7 days after stimulation with GR24 (3 nmol L^{-1}) (B, D). Photographs were taken before (A, B) and after (C, D) incubation with MMT for 6 hours. Bars 100 μm.

Results

The Mossman test use MTT as a marker of metabolic activities. When dissolved in a medium, oxidized MTT is yellowish in color. When applied to biological materials, the yellow MTT is reduced to purple formazan crystals by mitochondrial enzymatic activities. These crystals are insoluble in aqueous solutions, they are dissolved in acidified isopropanol and the resulting purple solution can be then measured spectrophotometrically. Following extrapolation, the results of this assay can be expressed in term of number of viable cells. Cytotoxicity of tested molecules or biological extracts can be then routinely assessed.

In the context of our study, when MTT was added 7 days post GR24-stimulation (dps), germinated broomrape seeds reduced MTT into formazan mainly at the apex of the radicle and in the seed body (Figure 1B, D). This activity was not observed in the non-germinated seeds (Figure 1A, C). Some of them displayed a red deposition in the seed body that did not correspond to the purple deposition of formazan salts (Figure 1C). First, the observed differential staining between germinated seeds and non-germinated seeds facilitated the observation of the germination process under a binocular microscope. Secondly, produced formazan crystals could be solubilized for absorbance reading. Therefore the Mossman's test has been adapted and validated in order to develop high-throughput bioassays for germination of obligate parasitic plant seeds. This method could be divided in five steps summarized in Figure 2: 1) seed sterilization, seed distribution and conditioning in 96 well plates, 2) seed germination and incubation, 3)

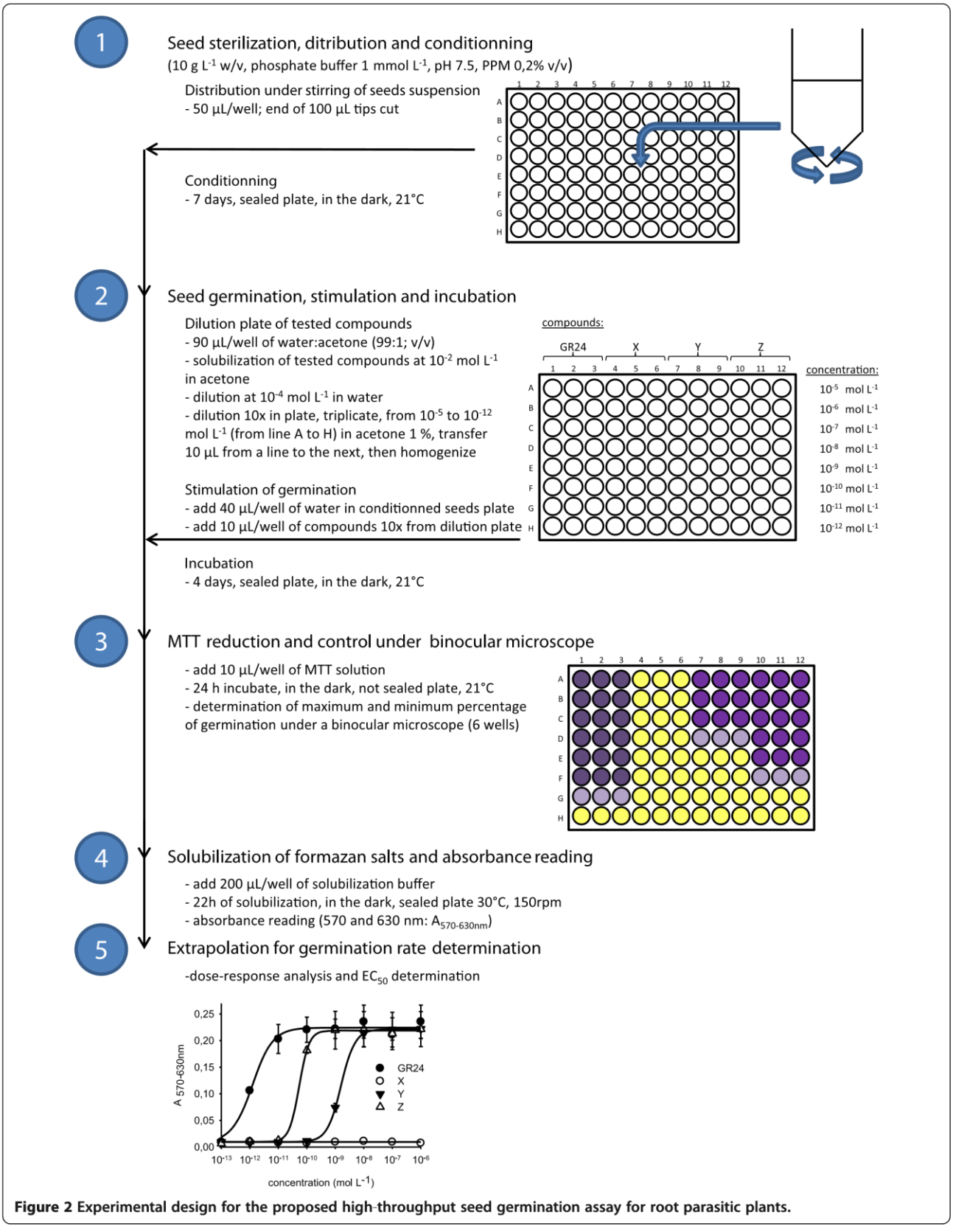


Figure 2 Experimental design for the proposed high-throughput seed germination assay for root parasitic plants.

MTT reduction and visual control under a binocular microscope, 4) solubilization of formazan salts and absorbance reading and 5) extrapolation of absorbance values for determination of germination rate. First of all, some steps had to be optimized including the pH buffer for seed germination and the length of seed germination after GR24-addition, MTT incubation, and formazan salt solubilization, as detailed here below.

Optimum pH for seed germination

Phosphate buffer in the germination medium were tested at pH 5, 6, 7 and 8. MTT was added 7-dps. When assessed under binocular microscope, the germination percentage was not affected by pH and reached 95 ± 5% (Figure 3). Similarly, following formazan crystal solubilization, absorbance was not significantly different (SNK, $p < 0.05$). However, when radicle was observed, a strong reduction in length was observed for acid pH values (Figure 3). A pH of 7.5 which did not impact germination and radicle development was chosen for MTT assay.

Kinetics of germination and MTT staining

The kinetics of germination rate, radicle length and MTT reduction were followed concomitantly during 7 dps in 96 well plate (≈125 seeds per well) (Figure 4). GR24 applied at 3 nmol L^{-1} induced 93 ± 4% of germination 7 dps (Figure 4). No staining was observed during the first ten hours (Figure 4 0-10h) except for a few spontaneously germinated seeds (2 ± 3%, data not shown). The slight red deposition appeared in seed body at 1 dps while the purple staining marked the radicle area (Figure 4 1d). Then MTT reduction was spread throughout the seed (Figure 4 2d). Radicle protrusion was observed 3 dps when a small germ tube (47 ± 6 μm) was measured (Figure 4 3d). Seed germination was synchronized (92 ± 5%, ±EC, n =8 wells). No significant change in germination rate was observed 3 dps (ANOVA, SNK, $\alpha = 0.05$). The radicle elongated until 6 dps when it reached its maximum size (176 ± 16 μm) (Figure 4 4d-7d). Therefore sensus stricto germination occurred in the first 3 dps and the following 3 days consisted in post-germination development. significant reduction of MTT could be detected spectrophotometrically from 1 dps (ANOVA, SNK, $\alpha = 0.05$). The activity increased regularly until 4 dps and then kept a maximal and stable value. In accordance with the kinetics obtained in these experimental conditions (21°C, pH 7.5), 4 dps duration was chosen for the MTT assay as an appropriate timing for maximal germination rate and MTT reduction.

Length of MTT incubation

The reduction of MTT was observed 4 dps only at the apex of the radicle after two hours of incubation in the MTT medium

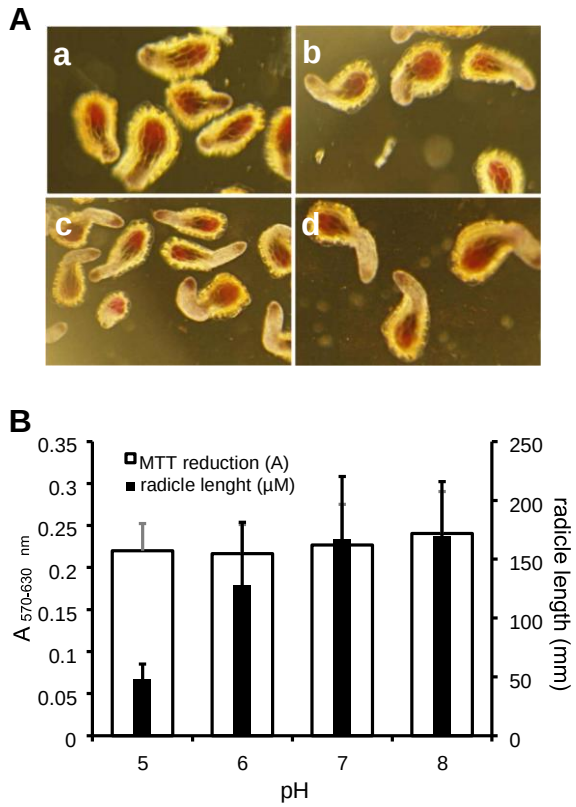


Figure 3 pH impact on seed germination and radicle growth in *Phelipanche ramosa*. Conditionned seeds were stimulated with GR24 (3 nmol L^{-1}) then incubated 7 days in Na, K phosphate medium (1 mmol L^{-1}) at pH 5 (**a**), 6 (**b**), 7 (**c**) and 8 (**d**). **A-** photographs were taken after MTT incubation for 6 hours. Scale bars 200 μM **B-** pH impact on MTT reduction by absorbance measurement at 530 nm minus at absorbance at 630 nm (± confidence intervals $\alpha = 0.05$, n = 3), radicle length (± confidence intervals $\alpha = 0.05$, n = 400), germination percentage were 95% ±4%.

(Additional file 1A), while it was spread throughout the germinated seeds over 6h of incubation. As shown by absorbance determination, once formazan was solubilized MTT reduction in germinated seeds was optimal for a 24 h-incubation in the MTT medium (Additional file 1B; ANOVA, SNK, $\alpha = 0.05$). Therefore, in accordance with the kinetics, 24 h-incubation in the MTT medium of the germinated seeds (4 dps) was chosen for the MTT assay.

Length of formazan salt solubilization

Using the Mossman procedure without modifications, absorbance was low few minutes after addition of solubilization buffer since most of the formazan salt deposition remained in the seed body. Germinated seeds are structurally more complex than cells due to the presence of teguments and others tissues, then the solubilization step needed to be extended. First, formazan salt solubilization from

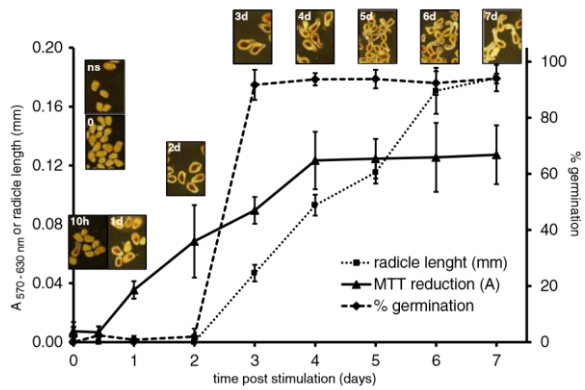


Figure 4 Kinetics of seed germination and radicle growth in *Phelipanche ramosa*. Conditionned seeds of *P. ramosa* were stimulated or not (ns) with GR24 3 nmol L^{-1} for 0, 10 hours, 1, 2, 3, 4, 5 , 6 and 7 days, then incubated with the MTT for 6 hours. Scale bars = 200 μm. Kinetics of MTT reduction was followed by absorbance measurement at 530 nm minus absorbance at 630 nm ($A_{570\text{-}630nm}$), radicle length and germination percentage counting under binocular microscope (± confidence intervals α = 0.05, n = 8).

seeds was followed by absorbance measurement during incubation in culture chamber conditions without agitation (21°C, darkness, Additional file 2 Maximum absorbance was obtained after 40 h of incubation and remained stable during 24 h (Additional file 2). Complete solubilization of formazan from seeds at this time point was confirmed through microscope observations (data not shown). The duration of solubilization could be significantly reduced by incubating the plates at 30°C in darkness under orbital shaking (150 rpm). Less than 22 h was required in those conditions for complete formazan solubilization and the absorbance was also stable during one day. These conditions (30°C, 22 h, under shaking) were selected for the MTT assay.

Linear relationship between MTT reduction and germination rate

To prove that the test can be used quantitatively to estimate germination rate, germination assays in 96-well plates were prepared using *P. ramosa* conditioned seeds and various GR24 concentrations from 10^{-15} to 10^{-6} mol L^{-1}. Controls were done without GR24 and with GR24 at used concentrations without conditioned seeds. MTT solution was added in each well 4 dps. Following 24 h incubation in MTT solution, plates were transferred at 30°C in darkness under orbital shaking (150 rpm) during 24 h for complete formazan salt solubilization. No MTT reduction was observed in the control wells containing only GR24 solutions (data not shown), proving that GR24 did not interact with MTT through oxidoreduction processes. As observed in Figure 5 and Table 1, the relationship between germinated seeds per well or germination percentage and absorbance was linear (R^2 =0.976 and R^2 =0.891, respectively). Therefore absorbance could be converted into germination efficiency expressed as either germinated seed number per well or germination percentage.

Using similar conditions and time courses, linear relationship between absorbance and germination efficiency was demonstrated for seeds of three other parasitic plants, *O. minor*, *O. cumana* and *S. hermonthica* (Table 1), despite difference in germination velocity could be observed according to the species: *O. cumana* and *S. hermonthica* seeds germinated and developed a long radicle (length > 200 μm) 4 dps, while no radicle emergence from micropyle was observed from germinated *O. minor* seeds at this time point.

Technical tips and tricks

Seed distribution in plate is the main critical step of the proposed protocol. Because the signal is proportional to the germinated seed number per well, seed distribution must be homogenous between wells in order to valid linear relationship between absorbance and germination percentage. So the suspension of sterilized seeds must be maintained in the tube under stirring throughout seed distribution in plate using a pipette. The end of tips must be cut to avoid seed clogging and mismatch seed distribution. Seed number per well should be both sufficient to neglect low variation of seed number per well and not too high for absorbance reading and control under microscope. Using the described conditions, 125 ± 11 seeds are usually added per well (± SD, n = 96). For seeds difficult to maintain in suspension, as observed in this study for O. cumana and O. minor, addition of Silwet-L77 or Triton X-100 as a detergent in the suspension medium facilitated seed distribution in plate. Concentration should be less than 0.001% otherwise higher concentrations inhibited germination (data not shown).

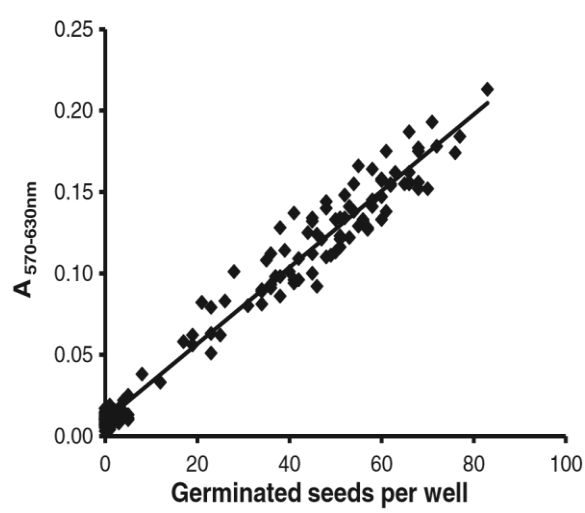


Figure 5 Linear relationship between MTT reduction and germination rate for *P. ramosa* seeds. y = 0.0023 x + 0.01; R^2 = 0.976, measurements 4 days post GR24 stimulation.

Table 1 Linear relationship between MTT reduction and seed germination rate for various parasitic plants

Species	Lot	Seeds/well	Linear regression	R_2
Phelipanche ramosa	St Martin de Fraigneau, France, 2005	120	A = 0.0023 gs + 0.011	0.976
Orobanche cumana	Longeville-sur-mer, France, 2009	110	A = 0.0019 gs + 0.009	0.965
Orobanche minor	Japan, 2010	80	A = 0.0043 gs + 0.032	0.977
Striga hermonthica	Gadarif, Soudan, 1999	90	A = 0.0127 gs + 0.016	0.920

A, Absorbance; gs, number of germinated seeds per well.

Most of the tested compounds were dissolved in solvents such as acetonitrile, acetone, ethanol, or dimethylsulfoxide.

Acetone, acetonitrile or ethanol percentages less than 0.1% did not alter the response of *P. ramosa* seed to GR24 (EC50 and maximum germination percentage). Dimethylsulfoxide can be used up to 1% (data not shown).

Compatibility of different buffers with seed germination was checked. Sodium phosphate buffer was compatible up to 10 mmol L^{-1} while sodium-potassium phosphate and HEPES buffers can be used up to 20 mmol L^{-1}. Higher concentrations dramatically inhibited *P. ramosa* seed germination (data not shown). Therefore Hepes or phosphate buffer were used routinely from 1 to 5 mmol L^{-1} at pH 7.5.

Despite seed sterilization and precautions during experiments, MTT reduction could be performed by contaminant microbial dehydrogenases in wells, then generating noise or false positives. To overcome this risk, Plant Preservative Mixture™ (PPM), a heat-stable broad spectrum biocide [23], has been added to the Na, K phosphate buffer before seed suspension and distribution in each well. PPM concentrations from 0.01 to 0.1% did not affect the dose–response curve of GR24 while concentrations above 1% inhibited *P. ramosa* seed germination (data not shown). PPM was usually used at 0.1% for the MTT assay.

Examples of application as proofs of concept

Interest for dose–response analysis

Standard MTT assay in 96-well plate was checked for dose–response analysis with *P. ramosa* seeds exposed to a large range of concentrations of candidate compounds (Figure 6). Using only one 96-well plate in this example, dose–response curves were obtained, with dilution replicates, for three natural SL and GR24 between 10^{-14} and 10^{-7} mol L^{-1}. Half maximal effective concentration EC_{50} and maximum of germination percentage of each compound were determined using a Four Parameter Logistic Curve (Table 2). EC_{50} reflects both the stimulant affinity to the receptor and the effectiveness of the induced response. In this example, since the four SLs triggered high and similar values of maximum germination (ANOVA, $P < 0.05$), EC_{50} can be discussed as a specific indicator of SL affinity to the receptor. So GR24 displayed the highest affinity, with EC_{50} at the picomolar range as also reported in previous studies for this *P. ramosa* genotype [4,24].

Sorgolactone and strigol affinities were about 50-fold lower while 5-deoxystrigol affinity was about 1000-fold lower (EC_{50} at the nanomolar range). This example proves that the MTT assay is appropriate for rapid and robust comparison of stimulant activities and will make easier structure-activity relationship studies [25-27].

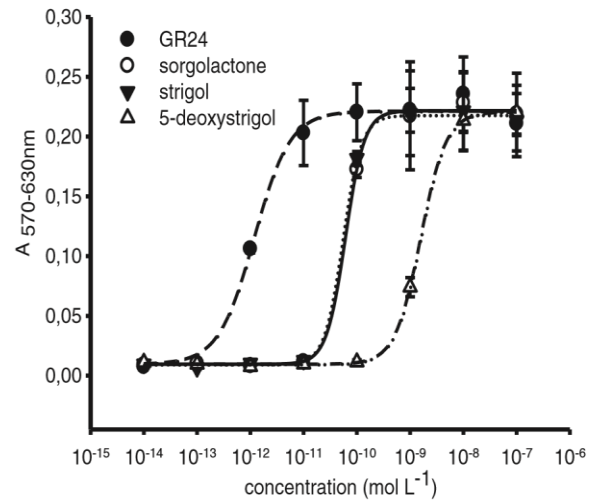


Figure 6 Activities of strigolactones on *P. ramosa* seed germination. Dose response activities of sorgolactone, strigol, 5-deoxystrigol and GR24 are modeled using a Four Parameter Logistic Curve (sorgolactone, solid line; strigol, dot line; 5-deoxystrigol, dash-dot line and GR24, dash line).

Table 2 Activity of different strigolactones on *P. ramosa* seed germination

	EC_{50} (mol L^{-1} ± SE)	A max (± SE)	R_2
Sorgolactone	6.1 ± 0.9 10^{-11}	0.222 ± 0.003	0.999
Strigol	5.4 ± 0.8 10^{-11}	0.218 ± 0.002	0.999
5-deoxystrigol	1.6 ± 0.05 10^{-9}	0.221 ± 0.002	1.000
GR24	1.4 ± 0.4 10^{-12}	0.222 ± 0.007	0.989

Analyses were performed with a Four Parameter Logistic Curve (maximum of absorbance, Amax).

Interest for phenotypic studies

Standard MTT assay in 96-well plate was checked for assessing susceptibility of seeds from four parasitic plants to GR24 (Table 3). One dilution plate of GR24 in triplicate from 10^{-6} to 10^{-13} mol L^{-1} was used. In this example, *P. ramosa* seeds displayed the highest sensitivity to GR24 at the picomolar range while *O. cumana* and *O. minor* seeds displayed EC values at the nanomolar range. Those findings support the hypothesis of variability and evolution of SLs receptors in parasitic plants [24-26], and prove the MTT assay is appropriate for discriminating different parasitic plant species or genotypes or races according to their sensitivity to germination stimulants. Moreover, the MTT assay is also adapted to evaluate the stimulant activity of plant root exudates on parasitic plant seed germination. As a proof of concept, Figure 7 shows the divergent activity of two oilseed rape lines on *P. ramosa* seed germination.

Interest for physiological studies

GR24 stimulates *P. ramosa* seed germination by breaking ABA dormancy [10]. Experiments using two 96-well plates with various ABA and GR24 concentrations proved that ABA inhibits germination in the presence of GR24 in a dose dependent manner (Table 4A). ABA IC_{50} ranged between 1.0 and 2.3 10^{-6} mol L^{-1}, without significant difference in the GR24 concentrations range tested (SNK, $p < 0.05$). Using ABA concentrations lower than ABA IC_{50}, no significant difference was obtained for maximum absorbance or maximum germination percentage with a large range of GR24 concentrations between 1 10^{-8} and 5 10^{-12} mol L^{-1} (SNK, $p < 0.05$). In the same way, ABA did not affect GR24 EC_{50} (SNK, $p < 0.05$; Table 4B). Nevertheless ABA reduced significantly maximum germination percentage for GR24 concentration higher than 10^{-7} mol L^{-1}(SNK, $p < 0.05$). These findings prove that ABA-related inhibition and GR24-related stimulation on P. ramosa seed germination are antagonist and uncompetitive processes. Thus standard MTT assay in 96-well plate is also an appropriate tool to study the physiological aspects of seed germination in parasitic plants.

Table 3 GR24 activity on seed germination in various parasitic plants

	EC_{50} (mol L^{-1} ± SE)	% max (± SE)	R_2
Phelipanche ramosa	1.4 ± 0.4 10^{-12}	89 ± 3	0.999
Orobanche cumana	4.0 ± 1.1 10^{-9}	80 ± 3	0.976
Orobanche minor	1.2 ± 0.3 10^{-8}	83 ± 4	0.936
Striga hermonthica	2.4 ± 0.7 10^{-11}	54 ± 2	0.912

Analyses were performed with a Four Parameter Logistic Curve (maximum of germination percentage, % max).

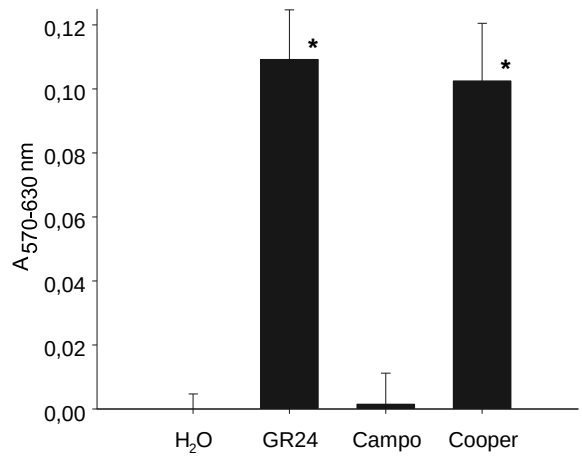


Figure 7 Root exudates activity of two *Brassica napus* elite lines on *P. ramosa* seed germination. Negative control, H_20; synthetic stimulant, GR24 3 nmol L^{-1} (means ± confidence intervals, α = 0.05, n = 6). Bars with asterisk are significantly different from the negative control (Holm-Sidak method, P < 0.05).

Table 4 Antagonistic role of ABA versus GR24 activities on seed germination in *P. ramosa*

A

GR24 (mol L^{-1})	IC_{50} (mol L^{-1} ± SE)	A max (± SE)	% max (± SE)
1 10^{-8}	2.3 10^{-6} ± 6 10^{-7}	0.332 ± 0.009	81 ± 0.3
1 10^{-9}	1.4 10^{-6} ± 1.4 10^{-7}	0.377 ± 0.004	92 ± 1.5
1 10^{-10}	1.2 10^{-6} ± 2.8 10^{-7}	0.395 ± 0.013	94 ± 0.8
5 10^{-11}	1.4 10^{-6} ± 4.2 10^{-7}	0.387 ± 0.013	94 ± 0.8
1 10^{-11}	1.6 10^{-6} ± 1.1 10^{-7}	0.394 ± 0.014	96 ± 1.1
5 10^{-12}	1.0 10^{-6} ± 1.1 10^{-7}	0.366 ± 0.013	89 ± 0.6
1 10^{-12}	nd	0.024 ± 0.12	4 ± 0.4

B

ABA (mol L^{-1})	EC50 (mol L^{-1}, ± SE)	A max (± SE)	% max (± SE)
5 10^{-5}	nd	0.004 ± 0.002	2 ± 2
1 10^{-5}	nd	0.004 ± 0.002	1 ± 2
5 10^{-6}	2.8 10^{-12} ± 1.2 10^{-12}	0.070 ± 0.020	15 ± 2
1 10^{-6}	4.8 10^{-12} ± 3.1 10^{-12}	0.260 ± 0.010	62 ± 1
5 10^{-7}	3.1 10^{-12} ± 2.1 10^{-12}	0.330 ± 0.010	80 ± 3
1 10^{-7}	4.8 10^{-12} ± 2.5 10^{-12}	0.370 ± 0.010	89 ± 1
5 10^{-8}	4.8 10^{-12} ± 2.5 10^{-12}	0.370 ± 0.010	89 ± 1
1 10^{-8}	4.6 10^{-12} ± 8.3 10^{-12}	0.400 ± 0.010	95 ± 1
5 10^{-9}	4.5 10^{-12} ± 7.7 10^{-12}	0.400 ± 0.010	96 ± 1
1 10^{-9}	4.6 10^{-12} ± 2.6 10^{-12}	0.400 ± 0.020	98 ± 2
1 10^{-10}	1.3 10^{-12} ± 3.6 10^{-12}	0.390 ± 0.020	94 ± 2
0	3.0 10^{-12} ± 0.7 10^{-12}	0.350 ± 0.010	85 ± 1

A- ABA IC_{50} versus GR24 concentration. **B-** GR24 EC_{50} versus ABA concentration (maximum of absorbance, Amax; maximum of germination percentage, % max; not determined, nd).

Discussion

Using a microscope, the germination rate of the tiny seeds of parasitic plants is usually determined by counting seeds showing a protruded radicle through the seed coat [8,28-32]. As reported for other dyes such as TTC [21,22], blue ink or Coomassie Blue [33], MTT staining contrasts the germinated seeds, and then facilitates observation and counting. On the other hand, unlike those colorants, MTT staining is appropriate for a spectrophotometric reading. So we described here a standard MTT assay in plate for the spectrophotometric determination of germination rates of parasitic plant seeds. It was carried out according to the Mossman‘s procedure for cell cultures [20] with major modifications due to the structural complexity of seeds compared to cells.

The kinetics of MTT staining during seed germination facilitates the discrimination between the induction of germination that was characterized by purple staining due to metabolic activities of the embryo, and the radicle protrusion and elongation (Figure 4). As shown for *P. ramosa* seeds (Figure 3), germination was induced by GR24 under a large range of pH while radicle protrusion and elongation were strongly affected by acid pH values. Within the MTT assay, pH effects on radicle length did not impact the absorbance reading since absorbance was correlated to germination rate independently to radicle elongation (Figures 3 and 5). Within the classical method using a microscope (without MTT), the distinction between non germinated seeds and germinated seeds with a very short protruded radicle (= false negative) is very difficult, increasing the risk of germination rate underestimation. The proposed spectrophotometric MTT assay gives a significant advantage for preventing these false negatives. However, because this method is not suitable to discern effects on radicle elongation, it is not relevant for testing compounds that affect radicle elongation.

XTT (2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl) 2Htetrazolium-5-carboxanilide) or other tetrazolium salts that form water-soluble formazan has been proposed to replace MTT in the Mossman’s procedure [34], yielding higher sensitivity and a higher dynamic range. In addition, the formed formazan dye is water soluble, then avoiding the final solubilization step. While first attempts to replace MTT by XTT in the incubation medium of *P. ramosa* seeds were positive (data not shown), experiments for XTT assay standardization were not carried out. Indeed, the fact that XTT does not contrast seeds represents a major inconvenient for the optical control of seed germination in plate.

Conditioning and germination of parasitic plants seeds could be affected by environmental conditions as temperature, light, water potential or salinity [35-38]. For *P. ramosa*, the developed method has shown that seeds germinated over a large range of pH (5 to 8). This finding proves that the spectrophotometric MTT assay is adapted to high throughput studies of environmental factors on kinetics of parasitic plant seed germination. The MTT assay is also appropriate for a number of other (high throughput) studies on parasitic plants including structure-activity relationship analysis of germination stimulants or inhibitors (allelochemicals), bioguided purification of natural allelochemicals from plant extracts, and studies on seed response to allelochemicals through pharmacological approaches. The MTT assay is also benefit for screening a number of plant root exudates (Figure 7) as part of studies on host spectrum of parasitic plants, screenings of germplasms for resistance breeding, and applied researches on allelopathic plants acting as potential catch or false host crops in order to reduce the parasitic pressure in infested fields.

Conclusions

To make easier and faster measurements of germination rate of parasitic plant seeds for high-throughput studies, we developed a spectrophotometric and standardized 96-well plate assay. The assay is based on the relationship between the induction of seed germination by stimulants and the increase in dehydrogenase activities of germinating seeds that is determined by reduction of exogenous methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (MTT). Compare to the classical microscope assay, the developed MTT assay decreases the length of experiments and especially the duration of the reading step (Table 5). In addition, several examples of applications were also shown, attesting that this assay will be a useful tool for both fundamental and applied researches on plant-parasitic plant interactions.

Methods

Plant material

Seeds of *Phelipanche ramosa* L. Pomel (genetic type 1, [39]) were collected in 2005 from Saint Martin de Fraigneau, France, on broomrape-parasitized winter oilseed rape (*Brassica napus* L.). Seeds of *Orobanche cumana* Wallr. were collected in 2009 from Longevillesur- mer, France, on broomrape parasitizing sunflower (*Helianthus annuus* L.); seeds of *Orobanche minor* Sm were kindly provided by Pr K. Yoneyama (Japan) and seeds of *Striga hermonthica* (Del.) Benth were collected in 1999 from Gadarif, East Sudan. The seeds were stored dry in the dark at 25°C until use.

Seeds of *Brassica napus* (L.) elite lines, Campo and Cooper, were provided by the breeder companies, Dekalb and Advanta respectively. Plants were grown and root exudates were collected 7 weeks after sowing according to Labrousse et al. (2001) [40].

Chemicals

GR24, sorgolactone, strigol and 5-deoxystrigol were kindly provided by Dr F-D. Boyer [24]. ABA and MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) were purchased from Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA). They were resuspended in acetone at 10 mmol L^{-1}, then diluted with water at 1 mmol L^{-1} (water/ acetone; v/v; 99/1). Control was prepared as acetone 1% (v/v). Dilutions of 1 10^{-3} mol L^{-1} to 1 10^{-15} mol L^{-1} were then performed in water/acetone (v/v; 99/1). ABA was solubilized in basified water at 10 mmol L^{-1} and then diluted in phosphate buffer (1 mmol L^{-1}, pH 7.5) from 10^{-3} to 10^{-10} mol L^{-1}. MTT was prepared at 5 g L^{-1} in distilled water then filtered at 0.2 μm (RC filters, Millipore) and stored at 4°C in the dark.

Table 5 Advantages and disadvantages of germination determination methods

	Classical microscope assay	Spectrophotometric MTT assay
Duration of the experiment	7 days	6 days
Duration of the reading step (96 well plate)	2-3 h	< 5 min
Sensitivity to false negative	yes	no
Radicle elongation determination	yes	no

MTT assays

Seed sterilization, distribution and conditioning in 96 well plates

Seeds were surface-sterilized according to Vieira Dos Santos et al. (2003) [41] with some minor modifications. Seeds were surface-sterilized in vigorous agitation in a 9.2° sodium hypochlorite solution for 5 min. Hypochlorite was removed by washing three times 30 s then three times 5 min with autoclaved deionised water. Then seeds were resuspended at a density of 10 g L^{-1} (dry seed weight/v) in Na, K phosphate buffer (1 mol L^{-1}, pH 7.5) containing PPM 0.2% (Plant Preservative Mixture, Kalys, Bernin, France), and distributed under stirring in 96-well plates (Cell Culture Multiwell Plate Cellstar; Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany), around 50 μL ≈ 125 seeds per well. Seeds were conditioned in sealed plates during 7 days at 21°C in darkness, excepted S hermonthica seeds that were conditioned at 30°C.

Seed germination, stimulation and incubation

Fresh root exudates (0.2 μm filtered), GR24, ABA or control were added and volumes were adjusted to 100 μL with water. Phosphate buffer was therefore adjusted at 500 μmol L^{-1} (pH 7.5) and acetone at 1/1000 (v/v). Negative controls were made with solvents, buffer and seeds minus tested chemicals. Blanks containing complete assay without seeds were also included in each test. Each molecule and concentration was tested on 3 well replicates against 3 replicates of blanks. Plates were incubated for seed germination as previously described at 21°C or 30°C according to the species.

MTT reduction and control under a binocular microscope

The MTT assays were carried out according to Mossman (1983) [20] with modifications. Ten micro litters of MTT solution per well was added. Plates were replaced in Culture chamber for 24 hours in darkness or overnight (unsealed plates, at 21 or 30°C according to the species). As a control of seed germination and MTT staining, both germinated seeds showing radicle protrusion and non-germinated seeds were counted before and after MTT addition and incubation using a zoom stereo microscope with 0.5 and 2 x objectives with darkfield illumination (SZX10, Olympus). Images were captured with a digital camera (E-330, Olympus) controlled by cell-A software (Olympus, Japan).

Solubilization of formazan salts and absorbance reading

Two hundred microlitters of solubilization buffer (Triton X-100 10%, HCl 0.04 mol L^{-1} in isopropanol) per well were added. Formazan salt deposition was solubilized in the lysis buffer for 22 hours in orbital shaker (150 rpm, 30°C). Absorbance was read using a EL800 Absorbance Microplate Reader (Biotek, Winooski, United States) equipped with 570 nm and 630 nm filters. For each well, the absorbance at a reference wavelength of 630 nm was subtracted from a test absorbance of 570 nm (A570-630nm).

Extrapolation of absorbance values for germination rate determination and dose response curves analysis

Linear regression, absorbance as a function of germination percentage, was computed with SigmaPlot 10.0. Dose–response curves, absorbance or germination percentage as a function of GR24 or ABA concentration, were modeled with a four parameter logistic curve computed with SigmaPlot 10.0.

Statistical analysis

Data were subjected to analysis of variance (ANOVA) with

EC_{50}, IC_{50} or germination percentage as the factor. Germination percentages were previously $\sin^{-1}$ (square root)-transformed to normalize the ratios.

Additional files

Additional file 1: Time course of MTT reduction by P. ramosa germinated seeds. Measurements 4 days post GR24 stimulation (3 nmol L^{-1}) and after 0, 4, 8, 12, 24, and 32 hours of incubation with MTT. Scale bars =100 µm. $A_{570\text{-}630\ nm}$ was expressed as percentage of maximum absorbance at 32 h. Absorbance was measured after solubilization in the following conditions (22 h, 30°C and orbital shaking 150 rpm) (n = 8; bar = SE).

Additonal file 2: Formazan salt solubilization. Solubilization from germinated seeds was assessed 4 days post G24 stimulation and after incubation with MTT for 24 hours at 21°C. Solubilization conditions: 21°C without shaking or 30°C under orbital shaking (150 rpm). $A_{570\text{-}630\ nm}$ was expressed as percentage of maximum absorbance measured after a solubilization period of 67 h at 21°C or 12 h at 30°C (n = 24; bar = SE).

Abbreviations

A: Absorbance; ABA: Abscissic acid; Dps: Day post stimulation; EC_{50}: Half maximal effective concentration; IC_{50}: Half maximal inhibitory concentration; MTT: Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide; PPM: Plant Preservative Mixture; SL: Strigolactones; TTC: 2,3,5 Triphenyl Tetrazolium chloride; XTT: 2,3bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

JBP and ZG designed the MTT assay. BA, MML and MG checked its efficiency for a number of applications, 3 of which were presented in the paper. PS and PD supervised ZG and MML's thesis, respectively, and drafted the manuscript. JBP supervised also ZG's thesis. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

This work was partially supported by funding awarded to the Ph-D students ZG and MML from the French Ministry of Education and Research.

Received: 24 May 2013 Accepted: 7 July 2013
Published: 6 August 2013

References

1. Parker C: **Observations on the current status of *Orobanche* and *Striga* problems worldwide.** Pest Manag Sci 2009, 65:453–459.
2. Rubiales D, Fernández-Aparicio M: Innovations in parasitic weeds management in legume crops. A review. Agron Sustain Dev 2012. 32:433–
449.
3. Yoneyama K, Awad AA, Xie X, Yoneyama K, Takeuchi Y: **Strigolactones as germination stimulants for root parasitic plants.** Plant Cell Physiol 2010, 51:1095–1103.
4. Auger B, Pouvreau JB, Pouponneau K, Yoneyama K, Montiel G, Le Bizec B, Delavault P, Delourme R, Simier P: **Germination stimulants of *Phelipanche ramosa* in the Rhizosphere of *Brassica napus* are derived from the glucosinolate pathway.** Mol Plant Microbe Interact 2012, 25:993–1004.
5. Virtue JG, DeDear C, Potter MJ, Rieger M: **Potential use of isothiocyanates in branched broomrape eradication.** In 15th Australian Weeds Conference, Managing Weeds in a Changing Climate; 2006; Adelaide, South Australia. Edited by Preston C, Watts JH, Crossman ND. Weed Management Society of South Australia Inc.; 2006:629–632.
6. Joel DM, Chaudhuri SK, Plakhine D, Ziadna H, Steffens JC: **Dehydrocostus lactone is exuded from sunflower roots and stimulates germination of the root parasite *Orobanche cumana*.** Phytochemistry 2011, 72:624–634.
7. Evidente A, Fernández-Aparicio M, Cimmino A, Rubiales D, Andolfi A, Motta A: **Peagol and peagoldione, two new strigolactone-like metabolites isolated from pea root exudates.** Tetrahedron Lett 2009, 50:6955–6958.
8. Evidente A, Cimmino A, Fernandez-Aparicio M, Andolfi A, Rubiales D, Motta A: **Polyphenols, including the new Peapolyphenols A-C, from pea root exudates stimulate *Orobanche foetida* seed germination.** J Agric Food Chem 2010, 58:2902–2907.
9. Evidente A, Cimmino A, Fernandez-Aparicio M, Rubiales D, Andolfi A, Melck D: **Soyasapogenol B and trans-22-dehydrocam- pesterol from common vetch (*Vicia sativa* L.) root exudates stimulate broomrape seed germination.** Pest Manag Sci 2011, 67:1015–1022.
10. Lechat MM, Pouvreau JB, Peron T, Gauthier M, Montiel G, Veronesi C, Todoroki Y, Le Bizec B, Monteau F, Macherel D, et al: **PrCYP707A1, an ABA catabolic gene, is a key component of *Phelipanche ramosa* seed germination in response to the strigolactone analogue GR24.** J Exp Bot 2012. 63:5311–5322.
11. Evidente A, Fernandez-Aparicio M, Andolfi A, Rubiales D, Motta A: **Trigoxazonane, a monosubstituted trioxazonane from Trigonella foenumgraecum root exudate, inhibits *Orobanche crenata* seed germination.** Phytochemistry 2007, 68:2487–2492.
12. Andolfi A, Boari A, Evidente A, Vurro M: **Metabolites inhibiting germination of *Orobanche ramosa* seeds produced by *Myrothecium verrucaria* and *Fusarium compactum*.** J Agric Food Chem 2005, 53:1598–1603.
13. Serghini K, de Luque AP, Castejón-Muñoz M, García-Torres L, Jorrín JV: **Sunflower (*Helianthus annuus* L.) response to broomrape (*Orobanche cernua* Loefl.) parasitism: induced synthesis and excretion of 7hydroxylated simple coumarins.** J Exp Bot 2001, 52:2227–2234.
14. Mabrouk Y, Simier P, Arfaoui A, Sifi B, Delavault P, Zourgui L, Belhadj O: **Induction of Phenolic Compounds in Pea (*Pisum sativum* L.) Inoculated by *Rhizobium leguminosarum* and Infected with *Orobanche crenata*.** J Phytopathol 2007, 155:728–734.
15. Mabrouk Y, Simier P, Delavault P, Delgrange S, Sifi B, Zourgui L, Belhadj O: **Molecular and biochemical mechanisms of defence induced in pea by *Rhizobium leguminosarum* against *Orobanche crenata*.** Weed research 2007, 47:452–460.
16. Zwanenburg B, Mwakaboko AS, Reizelman A, Anilkumar G, Sethumadhavan D: **Structure and function of natural and synthetic signalling molecules in parasitic weed germination.** Pest Manag Sci 2009, 65:478–491.
17. Yoneyama K, Awad AA, Xie X, Takeuchi Y**: Strigolactones as germination stimulants for root parasitic plants.** Plant Cell Physiol 2010, 51:1095–1103.
18. Ueno K, Fujiwara M, Nomura S, Mizutani M, Sasaki M, Takikawa H, Sugimoto Y: **Structural requirements of strigolactones for germination induction of *Striga gesnerioides* seeds.** J Agric Food Chem 2011, 59:9226–9231.
19. Goldwasser Y, Yoder JI: **Differential induction of *Orobanche* seed germination by *Arabidopsis thaliana*.** Plant Sci 2001, 160:951–959.
20. Mosmann T: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods 1983, 65:55–63.

21. Gonzalez-Verdejo CI, Barandiaran X, Moreno MT, Cubero JI, Di Pietro A: **An improved axenic system for studying pre-infection development of the parasitic plant *Orobanche ramosa*.** Ann Bot 2005, 96:1121–1127.
22. Aalders AJG, Pieters R: **In vitro testing with 2,3,5 triphenyl tetrazolium chloride (TTC) of *Orobanche crenata* seed metabolism.** FABIS Newsletter 1985, 13:35–37.
23. Guri AZ, Patel KN: **Compositions and methods to prevent microbial contamination of plant tissue culture media. In Book Compositions and methods to prevent microbial contamination of plant tissue culture media.** Washington, D.C: Plant Cell Technology, Inc; 1998. vol. 5,750,402. City.
24. Boyer FD, de Saint Germain A, Pillot JP, Pouvreau JB, Chen VX, Ramos S, Stevenin A, Simier P, Delavault P, Beau JM, Rameau C: **Structure-activity relationship studies of strigolactone-related molecules for branching inhibition in garden pea: molecule design for shoot branching.** Plant Physiol 2012. 159:1524–1544.
25. Zwanenburg B, Pospisil T: **Structure and activity of strigolactones: new plant hormones with a rich future.** Mol Plant 2013, 6:38–62.
26. Cohen M, Prandi C, Occhiato EG, Tabasso S, Wininger S, Resnick N, Steinberger Y, Koltai H, Kapulnik Y: **Structure-function relations of strigolactone analogs: activity as plant hormones and plant interactions.** Mol Plant 2013, 6:141–152.
27. Yoneyama K, Xie X, Yoneyama K, Takeuchi Y: **Strigolactones: structures and biological activities.** Pest Manag Sci 2009, 65:467–470.
28. Prandi C, Occhiato EG, Tabasso S, Bonfante P, Novero M, Scarpi D, Bova ME, Miletto I: **New potent fluorescent analogues of strigolactones: synthesis and biological activity in parasitic weed germination and fungal branching.** Eur J Org Chem 2011, 2011:3781–3793.
29. Mwakaboko AS, Zwanenburg B: **Single step synthesis of strigolactone analogues from cyclic keto enols, germination stimulants for seeds of parasitic weeds.** Bioorg Med Chem 2011, 19:5006–5011.
30. Macias FA, Garcia-Diaz MD, Perez-de-Luque A, Rubiales D, Galindo JC: **New chemical clues for broomrape-sunflower host-parasite interactions: synthesis of guaianestrigolactones.** J Agric Food Chem 2009, 57:5853–5864.
31. Galindo JC, de Luque AP, Jorrin J, Macias FA: **SAR studies of sesquiterpene lactones as *Orobanche cumana* seed germination stimulants.** J Agric Food Chem 2002, 50:1911–1917.
32. Román B, Satovic Z, Alfaro C, Moreno MT, Kharrat M, Pérez-de-Luque A, Rubiales D: **Host differentiation in *Orobanche foetida* Poir.** Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants 2007, 202:201–208.
33. Long S, Lendzemo V, Kuyper TW, Kang Z, Vierheilig H, Steinkellner S**: A simple staining method for observation of germinated *Striga* seeds.** Seed Sci Res 2008, 18:125–129.
34. Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KD, Monks A, Tierney S, Nofziger TH, Currens MJ, Seniff D, Boyd MR: **Evaluation of a soluble tetrazolium/ formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines.** Cancer Res 1988, 48:4827–4833.
35. Kebreab E, Murdoch AJ: **Modelling the effects of water stress and temperature on germination rate of *Orobanche aegyptiaca* seeds.** J Exp Bot 1999, 50:655–664.
36. Matusova R, Mourik T, Bouwmeester HJ: **Changes in the sensitivity of parasitic weed seeds to germination stimulants.** Seed Sci Res 2004, 14:335–344.
37. Hassan MM, Sugmuto Y, Babiker AGE, Yamauchi Y, Osman MGE, Yagoub SO: **Effect of NaCl on *Orobanche* spp and *Striga hermonthica* seeds germination during and after conditioning.** Biosci Res 2010, 7:26–31.
38. Takagi K, Okazawa A, Wada Y, Mongkolchaiyaphruek A, Fukusaki E, Yoneyama K, Takeuchi Y, Kobayashi A: **Unique phytochrome responses of the holoparasitic plant *Orobanche minor*.** New Phytol 2009, 182:965–974.
39. Voisin M, Duffé P, Perez E, Hadjou F, Delavault P, Delourme R, Simier P: **Host specificity and genetic diversity of the parasitic plant *Phelipanche ramosa* on winter oilseed rape in France.** In 13th International Rapeseed Congress; 5-9/06/ 2011; SPZO s.r.o. (Svaz pěstitelů a zpracovatelů olejnin-The Union of Oilseed Growers and Processors) Prague, Czech Republic. 1352:1205–1208.
40. Labrousse P, Arnaud MC, Serieys H, Bervillé A, Thalouarn P: Several mechanisms are involved in resistance of Helianthus to Orobanche cumana Wallr. Ann Bot 2001, 88:859–868.
41. Vieira Dos Santos C, Letousey P, Delavault P, Thalouarn P**: Defense Gene Expression Analysis of *Arabidopsis thaliana* Parasitized by *Orobanche ramosa*.** Phytopathology 2003, 93:451–457.

doi:10.1186/1746-4811-9-32

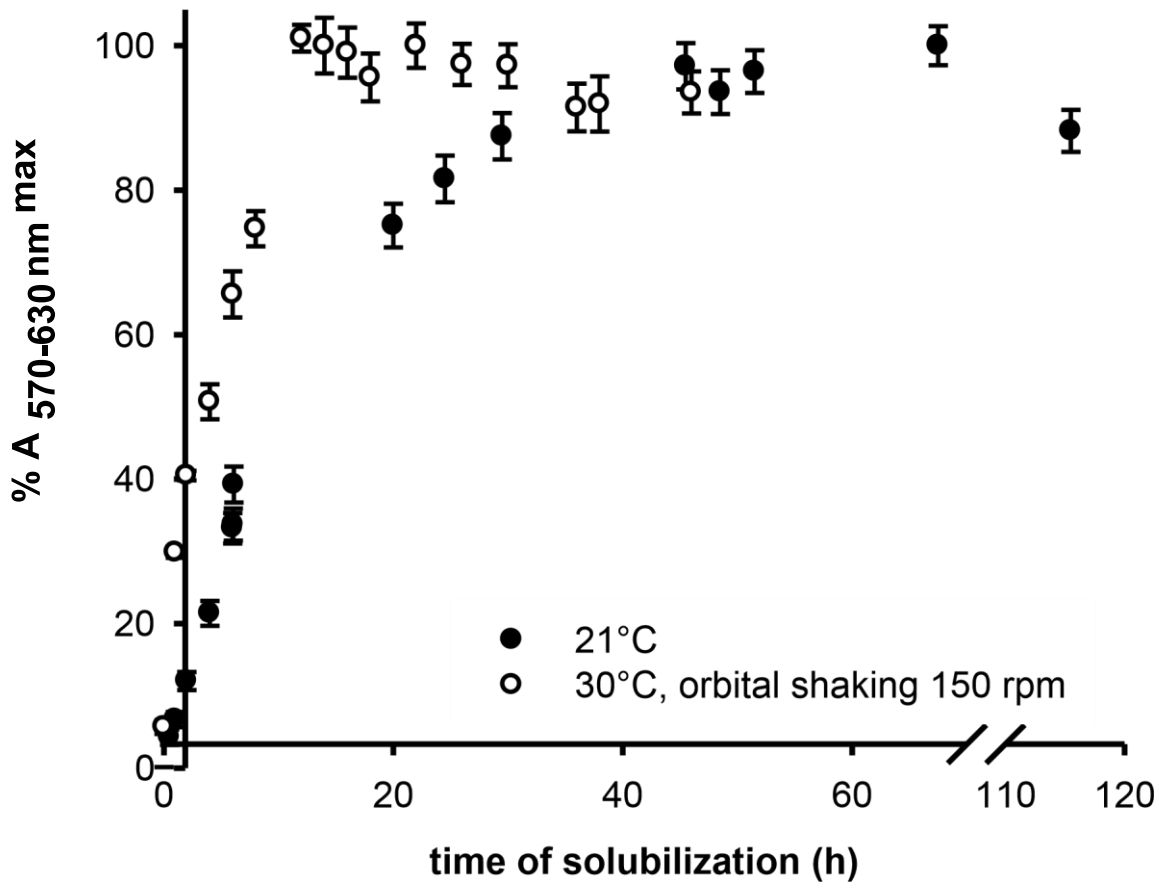
Cite this article as: Pouvreau et al.: A high-throughput seed germination assay for root parasitic plants. Plant Methods 2013 9:32.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

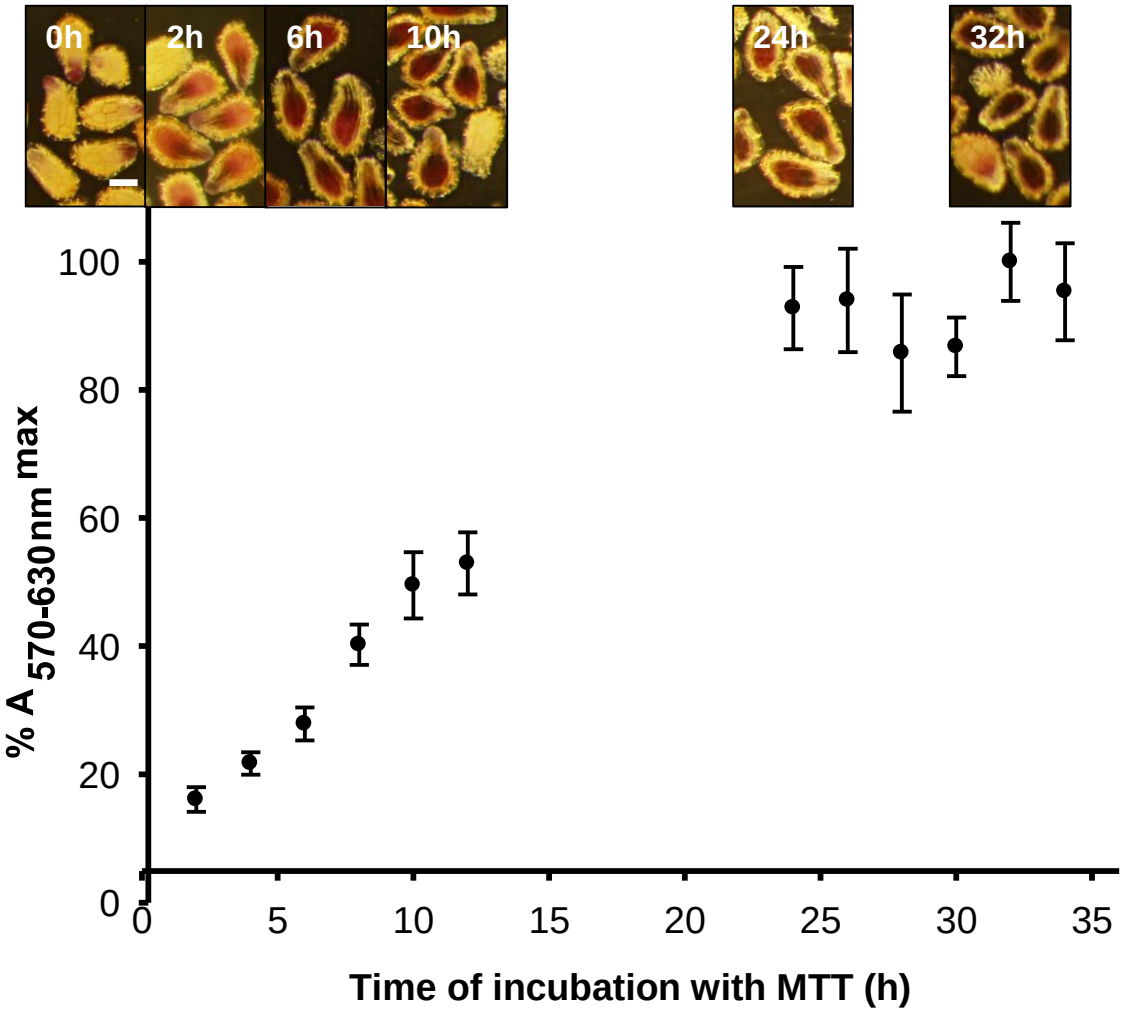
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit

BioMed Central



Additional file 1: Time course of MTT reduction by P. ramosa germinated seeds. Measurements 4 days post GR24 stimulation (3 nmol L^{-1}) and after 0, 4, 8, 12, 24, and 32 hours of incubation with MTT. Scale bars =100 μm. $A_{570\text{-}630\ nm}$ was expressed as percentage of maximum absorbance at 32 h. Absorbance was measured after solubilization in the following conditions (22 h, 30°C and orbital shaking 150 rpm) (n = 8; bar = SE).



Additonal file 2: Formazan salt solubilization. Solubilization from germinated seeds was assessed 4 days post G24 stimulation and after incubation with MTT for 24 hours at 21°C. Solubilization conditions: 21°C without shaking or 30°C under orbital shaking (150 rpm). $A_{570\text{-}630\ nm}$ was expressed as percentage of maximum absorbance measured after a solubilization period of 67 h at 21°C or 12 h at 30°C (n = 24; bar = SE).

Annexe 2

Séquences nucléotidiques en ADNc des gènes étudiés

> *Phelipanche ramosa* PrHSP81.1-CDS (2100 bp)

ATGTCGGATACCGAGACGTTTGCTTTCCAGGCTGAGATCAACCAGCTTTTGAGTCTGATCATCAATACTTTCT
ACAGCAACAAGGAGATTTTTCTTCGTGAATTGATCAGTAACTCATCTGATGCTTTGGACAAAATTCGTTTTGA
AAGCTTGACCGATAAGAGCAAGCTTGATTCTCAGCCGGAGTTCTTCATCCATATCATCCCTGACAAGACCAA
TAACACCTTGACAATTATTGACAGTGGTAATGGCATGACCAAGTCTGATTTGGTGAACAATCTTGGTACAATT
GCAAGGTCTGGAACCAAGGAATTCATGGAAGCCCTTGCTGCTGGTGCTGATGTAAGCATGATTGGACAATTT
GGTGTTGGTTTCTACTCTTCTTATTTGGTTGCCGACAAGGTAGTTGTCACGACAAAGCATAACGATGATGAAC
AATATGTCTGGGAATCCCAAGCGGGAGGTTCATTCACTGTCACTAGAGATACATCTGGTGAAAACCTAGGCA
GGGGTACTAAGATGACACTCTTCCTCAAAGAGGATCAGCTTGAGTACCTTGAGGAACGCAGGCTGAAGGATT
TGGTTAAGAAGCACTCTGAATTTATCAGCTATCCGATTTCTCTTTTGGTTGAGAAGACTACAGAGAAGGAAAT
CTCGGACGACGAGGATGAGGAAGACAAGAAGGATGAGGAAGGGAAGGTTGAGGAAGTCGATGAAGACAAG
GAAAAAGCCGACAAGAAAAAGAAGAAGATCAAGGAAGTGTCCCATGAGTGGGATTTGGTGAACAAGCAGA
AACCTGTCTGGATGAGGAAACCTGAGGAGATTACGAAGGAAGAGTATGCTGCTTTCTATAAAAGCCTTACCA
ACGACTGGGAGGAGCACTTGGCTGTGAAACATTTTTCGGTCGAGGGGCAGCTTGAGTTTAAAGCTGTTCTCTT
TGTTCCTAAGAGGGCTCCGTTTGATCTATTTGATACGAAGAAGAAGCCCAATAACATTAAGCTCTATGTTCGT
CGTGTTTTCATCATGGACAACTGTGAAGAGCTGATGCCTGATTATCTAAGCTTTGTCAAGGGCATTGTCGACT
CTGAGGATTTGCCTCTCAATATTTCCCGTGAGATGTTGCAGCAGAACAAGATCTTGAAGGTTATCCGCAAGA
ACCTGGTGAAGAGATGCATTGAGCTCATCTTTGAGATTGCCGAGAACAAGGAAGATTACAACAAATTCTACG
AGGCTTTTTCCAAGAACCTGAAGCTTGGCATCCACGAGGATTCTCAAAACAAGACTAAGCTTGCTGAGTTGC
TAAGGTACCACTCTACTAAAAGTGGTGATGAGATGACCAGCCTGAAGGACTATGTCACAAGAATGAAGGAA
GGTCAGAATGACATCTACTACATCACCGGTGAGAGTAAAAAGGCTGTTGAGAACTCTCCATTCCTTGAGAGG
CTAAAGAAGAAAGGATATGAAGTCCTCTACATGGTGGATGCCATTGATGAGTATGCTGTAGGACAGTTGAAG
GAATTTGAAGGCAAAAAGCTTGTCTCTGCCACCAAGGAAGGTCTCAAGCTTGAGGAAAGCGAAGACGAAAA
GAAGAAGAAGGAAGAGCTCAAGGAGAAGTTTGAGGGCTTGTGCAAAGTGATTAAGGATGTTCTTGGAGACA
AAGTAGAGAAAGTGATTGTCTCTGATCGTGTGGTGGACTCTCCTTGCTGTTTGGTTACGGGTGAATATGGATG
GACAGCTAACATGGAAAGGATCATGAAGGCACAGGCTTTGAGGGATTCTAGCATGGCTGGTTACATGTCGAG
CAAGAAAACGATGGAGATTAATCCGGAGAATCCTATCATGGAGGAATTGAGGAAGAGGGCTGACGTCGATA
AGAACGATAAGTCTGTCAAGGATTTGGTTATGTTGTTGTTTGAGACGGCTTTGCTTACTTCTGGGTTTAGTCTC
GATGACCCCAACACCTTCGGGAACAGGATTCATAGGATGTTGAAGCTTGGTCTGAGCATTGATGAGGATGCC
GGTGATGCCGATGTGGATATGCCGGCGTTGGAGGAGGTGGAGGCTGATGCCGATGGGAGCAAGATGGAGGA
GGTGGACTAA

> *Phelipanche ramosa* PrHSP70.1-CDS (1712 bp)

GAAGATTCACCGACCCATCTGTTCAGAGTGACATGAAACTGTGGCCGTTCAGGGTGATTGCAGGTCCCGGGGA
CAAGCCCATGATTGTAGTTTCCCACAAGGGCGAGGATAAGCAATTTGCTGCGGAGGAGATATCTTCCATGGTC
CTCATCAAGATGAAGGAAATTGCCGAGGCATACCTTGGGTCGACAATAAAGAATGCTGTTGTGACTGTGCCTG
CGTATTTCAATGACTCTCAGCGTCAGGCGACCAAGGATGCTGGAGTAATTGCCGGTCTTAATGTTATGCGTATC
ATTAATGAACCAACTGCTGCAGCCATAGCATATGGCCTCGACAAGAAGGCTAGTAGTGCTGGTGAGAAGAACG
TGCTTATTTTCGATCTTGGTGGTGGTACATTTGATGTCTCACTCCTCACAATCGAGGAGGGGATTTTCGAAGTCA
AGGCGACAGCTGGTGACACTCATCTTGGAGGGGAGGACTTTGATAACAGAATGGTGAATCACTTTGTTCAAGA
GTTTAAGAGGAAGCACAAGAAGGATATTAGTGGGAACCCCAGAGCTTTGAGGAGACTGAGGACTGCCTGTGA
AAGGGCAAAGAGGACTCTCTCATCGACCGCTCAGACCACCATTGAAATTGATTCTTTGTATGAGGGTGTTGATT
TCTACACAACCATTACCCGTGCTAGATTTGAGGAACTGAACATGGATTTGTTCAGGAAGTGCATGGAGCCGGT
CGAGAAGTGCTTAAGGGATGCAAAGATGGACAAGAGTACTGTTCATGATGTCGTCCTTGTTGGTGGCTCGACT
AGGATCCCGAAGGTTCAACAATTATTGCAGGATTTCTTTAATGGTAAGGAGCTATGCAAGAGTATAAACCCTG
ATGAAGCTGTTGCTTATGGAGCTGCTGTGCAAGCCGCAATCTTGACAGGTGAAGGCAATGAAAAGGTGCAGGA
TCTTCTTCTTTTGGATGTGACTCCGTTGTCTCTTGGTTTGGAAACTGCTGGGGGTGTGATGACTGTTTTGATTCC
GAGGAATACGACCATTCCTACCAAAAAGGAACAAGTGTTCTCTACGTACTCGGACAACCAGCCTGGTGTGTTG
ATTCAGGTTTTTGAAGGTGAAAGGACGAGGACGAAAGATAACAATTTGCTCGGGAAATTTGAACTGTCCGGCA
TTCCTCCGGCGCCAAGAGGTGTACCTCAGATCACTGTTTGCTTTGACATTGATGCCAATGGAATCTTAAATGTG
TCTGCAGAGGACAAGACGACGGGTCAGAAGAATAAGATCACCATAACCAACGATAAGGGAAGGCTCTCGAAG
GAAGAGATTGAGAAGATGGTGCAAGAAGCCGAGAGGTACAAGTCGGAGGATGAGGAGCATAAAAAGAAGGT
TGAGTCGAAGAATGCATTGGAGAATTACGCGTACAACATGAGGAACACCATCAAGGATGACAAGATAGGTGG
CAAGCTTCCGGCAGCCGAAAAGAAGAAGATCGAGGATGCAGTCGAGTCGGCTATTCAGTGGTTGGATGGGAA
CCAGCTGGCAGAGGCTGATGAGTTTGAAGACAAGATGAAAGAGCTTGAAGGCATTTGCAATCCGATTATAGCC
CAGATGTACCAGGGGGGTGTTGGTGCTGACATGGCTGGAGGTGCAATGGACGAAGATGGTCCGGCCGGCAGC
AAGGGTGCAGGTCCCAAGATTGAAGAGGTCGAT

> *Phelipanche ramosa* PrROF1-CDS (1716 bp)

ATGGAGGATGATTTCGAGATGCCCGCCGCGGAGGGACTCGACGAGGATATGGATCTGCCAGAGGGGAGCACC
TACATGAAAGTAGGAGAGGAGAAGGAGATTGGTTCTGAGGGTTTGAAGAAGAAGCTTCTTAAGGAAGGTGAA
GGCTGGGACAGTCCGGATAATGGTGATGAAGTTGAAGTTCATTACACTGGCACGCTACTGGACGGGACTAAGT
TTGATTCGAGCCGTGATAGGGGAGAGCCTTTCTCGTTTGCTCTCGGCCAAGGACAAGTCATCAAGGGATGGGA

CCTTGGTATCAAAACGATGAAGAAGGGCGAAAATGCCATCTTCACCATACCACCCGAGTTGGCATATGGGGCA
TCTGGCTCACCCCCTACTATCCCCCCAAATGCAACCTTGCAGTTCGATGTTGAATTGCTGTCTTGGGCCAGTGTC
AAGGATATCTGCAAGGATGGTGGGATATTCAAAAAGATTCTCAAAGAGGGAGAGAAATGGGAGAACCCTAAG
GATGCTGATGAAGTGATTGTGAATTATGAGGCGAAGCTGGAAGATGGAACTGTGGTTTCTAAAGGAGATGGTG
TTGAATTCACCGTTGAAGGAGGTCATTTTTGTCCTGCTCTATCCAAGTCTGTTAAAACAATGAAGAAAGGTGAA
AAGGTCCTTCTTTCGGTCAAACCACAATATGGGTTTGGTGACAGAGGCAAACCAGCCTCTGGTAATGAAGGGG
CAGTTCCACCCAATGCTAACTTGAATATAACTCTGGAGTTGGTGTCCTGGAAAACAGTTTCTAATGTTACTGAT
GACAAGAAAGTAGTGAAGAAGATTCTCAAAGATGGAGAGGGCTTTGAGCGCCCTAATGAAGGAGCTGTTGTA
AAATTGAAATTGGTCGGAAAGCTGCAGGATGGTACTGTTTTTGTGAAGAAGGGAGATGATGAAAATGATCTCT
TTGAATTCAAGACTGATGAAGACCAAGTAATTGAGGGGTTGGACAAGGCTGTGGCTACAATGAAAAAGGGAG
AGGTTGCCCTCTTAACTATTGCCCCTGAGTATGCATTTGGTTCGTCCGAGTCGAAGCAAGACTTGGCTACGGTT
CCTGCAAATGCGACAGTGCACTATGAGATTGAGCTTGTCTCATTTGTCAAGGAAAAGGAATCTTGGGATATGA
ACACGGAAGAGAAAATTGAGGCAGCTGGTAAGAAAAAGGAAGAAGGAAATGCATTGTTCAAAGCTGGGAAAT
ATATGAGAGCTTCGAAGAGATATGAGAAGGCTGCCAAATATATTGAATATGATACTTCTTTTAGCGAGGACGA
AAAGAAGCGGTCTAGATCCTTGAGGGTGACTTGCAACTTGAATAATGCAGCTTGCAAGTTGAAACTCAAGGAA
TACAAGCAGGCAGAGAAGCTTTGCACTAAGGTTTTGGAGCTTGAGAGTACAAATGTGAAGGCACTGTACAGAA
GGGCTCAAGCATATATGAACTTGTCCGATTTGGATTTGGCTGAATTTGATATAAAGAAAGCTCTTGAAATTGAC
CCTGGTAACAGGGATGTGAAGCTTGAATATAAAACCCTCAAAGAGAAGGTCAAGGAATTCAATAAGAAGGAT
GCCAAGTTTTACGGAAATATGTTTGCAAAACTGAATAAATTGCAGCCTGTTGATCCTGATAACACAGCTGCGA
AGGAGCCTGAGGCTATGAGCATTGACAGCAAGGCATAG

> *Phelipanche ramosa* PrD14-CDS (801 bp)

ATGGGGCACAGACTGTTAGAAGCGTTGAACGTCAAAGTGGTGGGCTCCGGCAAAAAAATCTTAGTCCTATCCC
ATGGCGTCGGCACCGATCAGTCGGCGTGGCAGCGTATCTTACCGTACTTCCTCCGCGACCACCGGATCGTGCTC
TATGATCTGGTCTGCGCCGGCAGCGTCAACCCTGAGTACTTCGATTTCCGCCGCTACACCTCCCTCGACGCCTT
CGTCGACGATCTCCTTTACATACTCGACGCTCTCCACATCGATAGGTGCACCTATGTCGGCCACTCAGTTTCCG
CCACGATCGGGATTCTAGCTTCGATTCGCCGTCCTGAGCTTTTCACTAAGCTCATCCTCATCGGCGCTTCCCCAA
GGTTTCTTAACGACGCGGACTACCACGGCGGGTTCGAGCATGGAGAGATCGAGAAGGTTTTCTCTGCAATGGA
GGCGAACTACGAGGCTTGGGTGAGCGGCTTCGCGCCGCTGGCGGTGGGGGCGGACGTGCCGGAGGCCGTGCG
TGAGTTCAGCCGAACGCTGTTCAACATGAGGCCTGACATAACGCTGTTCGTGTCTCGGACGGTGTTCAACAGCG
ACCTGAGAGGGGTGCTGGGACTGGTGAAGGTGCCGTGCTCCATCATTCAGACAGCGAAGGACCATTCGGTGCC
GTCATCTGTGGCGACGTACCTTGAGAACCACCTCGGGATGGAAAGCACGGTGCACATGCTGGATATTGAAGGC
CACCTGCCGCATCTCTCCGCCCCAAATCTGCTAGCGCAGGAGCTCCGGCGGGCGTTACCACCGTGA

> *Phelipanche ramosa* PrKAI2.1-CDS (810 bp)

ATGACCACAATTGGATCAGCTCACAACGTTAATGTCTTGGGCTCCGGCGAGATCACCGTCGTCCTCAGCCATGG
GTTCGGTACCGATCAATCCGTATGGAAATATTTGGTCCCTCACCTCGTTGACCAATACAGAGTCATACTTTTCG
ATAACATGGGCGCCGGCACAACCAACCCGGACTATTTCGATTTCGATCGTTACTCAACCGTGGAAGGCTACGC
CTACGATCTGATAGCCATTTTGGAGGAATACAACGCCGGGAAATGTATATTTGTCGGCCACTCTCTGTCCGCCA
TGGTCGGAATCTACGCCTCGATTTTAAGACCGGAACTGTTTCGTAAACTGATCACCATATCCGCTACCCCAAGG
GTCATGAACACGGATGATTACCATGGAGGATACGAGCAAAAAGATATCGACCAGCTTGTGAACGCGATGGAA
ACGAACTACTATTCTGCAGTCTCCGGGATGCCGGCGATGGTGATCGGCAGCGACCTGGACTCGAAAGCGGTGC
AGGAATTCAGTCGGACACTATTCAACGTACGACCCGACATAGCCCTTAGCGTGATTCGTGTTATATGTGGAATG
GATATGAGATCCTTTTTAGAGCACGTGACAGTGCCGTGCCACATCATCCACAGTTCTAAGGATACCAGGGTGG
CATCGAAATCGGCGTACTATCTCCACGAGAACATCGGGGCAAGGTCTACTGTCGAGGTGATGCCCACGGAACG
ACACCTGCCGCATCTTAGTGCGCCAGAGGTCACCACTCCCGTGTTAGTCCGACATATACAACACGATATTGTTT
GA

> *Phelipanche ramosa* PrKAI2.2-CDS (816 bp)

ATGAGCCCATTAGGAGACGCTCATAACGTTCGAGTCTTGGGATCCGGCGAGAGAACCGTCGTCCTTAGCCATG
GCTACGGCACCGATCAGTCCATATGGAGACATTTGGTCCCACACCTCGTCGACGATTTCAGGGTCGTACTTTAC
GATAACATGGGTTCGGGACCAACTAATCCGGACTACTTCGACTTCGAACGTTACGCAACCCTAGAAGGCTACG
CCCACGACTTGATCGCCATTTTGATGGAATTTAGCTTCGGCAAATGCATTTACGTCGGACACTCTTTGTCTGCCA
TGGCCGGACTCTACGCTTCGATTTTAAGACCCGACCTGTTTCATAAAATGATCATGCTCTCCGCTACCCCAAGG
ATGTTGAACGAGATTGATTACCATGGAGGATTCGAGCAAAAAGATCTCGACCAGCTCTTAGACATGGGGATAC
AGAACTACAAATTACTGGAATCGGGAAGGGCGCCGCTGATGATCGCATGTGACATGGACTCGGTGGTGATGCA
GGAAGTCTGTCGGACGCTATTCAACATGCGTCCCGACATATCTCTAAGCTTGGTTCGTACGATGCACACATATG
ATATGCGACCATTTCTCAAGGACGTGACGGTGCCGTGCCATATCATTCAAAGCACTAAGGATTGGGCGGTGCC
GGTGAAAGTGTCGCGGTATCTCCAGGAGAACATCGGGGCAAAGTCGACTGTCGAGGTGATGTCGACTGAAGGC
CACTATCCGCATCTTACTGCGCCTGAGGTCACGATCCCGGTGTTGCTCCGACATATACACCGCGATATTGCTGA
TGCCTGA

> *Phelipanche ramosa* PrKAI2.3-CDS (816bp)

ATGAGCTCAGTTGGACCAGCTCACAAYGTTCGAGTCTTGGGCTCCGGCGAGACCACCGTCATCCTCAACCAAT
GCTGCGCCACTGATCAATCCATCTGGAAATACTTTACCCCACTCCTCGTTGACCAATACAGAGTCATACTTTTC
GATAACATGGGCTGCGGCACAACCAACCCGGACTGCTTCGATTTCGAACGTTACGCAACCATCGAAGGCTATG
CCCTTGACTTGATTGCCATTTTGGAGGAATTTAGCGTTGGAAAATGTATATACGTCGGCCACTCTATGACATCC
ATGGTCGGAGTCTACGCCTCGATTTTAAGACCGGATCTGTTTCATAAGCTGGTCATGCTATCTGCTTCCCCGAG
AGTGACGAATACGGAGGGATACGAAGGAGGATACAAGCAGGAAGAGGTTGACCAACTCTACAGAGCGATGGA
ATTGAACAATGAGTCCTTTCAGTTGGGATTCGCACCCCTTCTGATCGGCGTCGATCAGGGCTCACCAGTCGCAC
AGGAATACTCTCGAACCATGTTCAACATGCGACCCGACATATCTATGTCCGTGCTTCGTACAATTTCCACATTA
GATATGAGACACTTGCTACCACACGTGACGGTGCCGTGTCATATTATTCAGAGCTCTCAAGACGCGATGATTCC
GGAAGGGATGGCGGAGTATATCCACCAAAACCTTGGCGGGAAGTCGATCGTGGAGCTGATGCCCATCGAAGG
ACACCTGCCGCAACTCAGTATGCCGGAGGTTACGAATCCAGTGCTGCTCCGACATATACACCACGATATTGTTG
ATGCCTGA

> *Phelipanche ramosa* PrKAI2.4-CDS (813 bp)

ATGGGAATCACCCAAGAAGCTCACAACGTTCGGGTGCTGGGGTCCGGGTTACAGACAGTTGTCCTAGCCCACG
GGTTCGGTACTGACCAGTCCATTTGGAAACAGCTTGTTCCGCACCTTGTGGATGAATATAGGGTGGTGCTATAT
GACAATATGGGCGCGGGTACGACTAACCCAGATTACTTCGACTTTGAAAGATATTCTACCTTGGAAGGCTATG
CCTATGACGTGATCGCCATTTTACAGGAGCTGCAGATAAGTTGTTGCATATACGTTGGCCATTCTGTCTCGGCT
ATGATTGGTTTTGTTGCATCCATCACAAGGCCAGATCTTTTCACTAAGATTGTCACTGTTTCTGGTTCTCCGAGG
TACTTGAACGACCCGGGTTACTTTGGAGGATTCGAACAAGACGAACTTACACAATTATTCGACGCCATGAAAT
TAAACTACAAATCATGGTGTTCTGGATTCGCGCCCCTATGCGTGGGGGGCGATATGAAGTCAATGGCTGTTCAA
GAGTTTAGTCGGACTTTGTTCAACATGAGACCGGACATAGCATTGAGCGTGGCTCAAACTATATTTTATAGTGA
CATGAGACCTCTTTTAGGTCACGTCACTGTCCCATGCCACATAATCCAGAGCATGAAGGACTTGGCTGTGCCGG
TGGAGGTTTCTGAGTATCTCCACCAGAGCCTTGGGGGCGAGTCTATCGTTGAGGTCATGGCCACCGAAGGCCA
CCTGCCGCAGTTGAGCTCGCCGGATGTTGTGGTCCCTGTGCTTCTTAGGCACATCCGTTATAATATTGCTGCCTG
A

> *Phelipanche ramosa* PrKAI2.5-CDS (825 bp)

ATGAACATTAACAGAGACATCGGAGCAGCTCACAACGTAAATGTTCTCGGCTCCGGCGAGACCACCGTCGTCC
TCGCCCACGGCTTCGGCACCGATCAGTCCGTCTGGAAGTATCTGGCCCCACACCTCGTCGACAATTTCCGGGTG
GTACTTTTCGATAACATGGGCGCCGGCACAACCAACCCGGACTACTTCGATTTCGACCGTTATGCGACCCTGGA
AGGCTACGCCGATGACTTGATCGCCATTCTGGACGAGTTCACCGCCGGAAAATGTATCTACGTCGGCCACTCTC
TGTCCGCCATGGCCGGAGCTTACGCCTCCATACTAAGGCCCGATCTGTTTCATAAACTGATCACGATCTCCACT
TCCCCGAGGTCGTTGAACTCGGATGATTACCGAGGAGGATTCGAGCAGAAAGATCTGGATCAACTCTTAGACG
CGATGGTCACGAACTTCGAGTCATTGGTGTTGGGGATGGCGCCGCTGGCGATCGGCGGCGACATGGACTCGAC
GGTGGTGCAGGAGTTCAGTCGGACGCTATTCAACATGCGTCCCGACATAGCCTTGAGCGTGGTCCGTACGGTA
CTCACGTACGATATGCGACCGTTCCTAGGGCACGTGACGGTGCCATGCCACATCCTTCATAGTTGTAAGGATTG
GGTGGTGCCGCCGGCTGTGGCCGAGTATATCCATCAGAACCTCGGGGGAAAGTCGATCGTGGAGATGATGCCC
ACCGAAGGACACCTGCCGCATCTCAGCATGCCGGAGATCACAGTCCCGATACTACTCCGACATATACAGCATG
ATATTGCAGATGCTAAT

> *Triphysaria versicolor* TvCYP707A1-FL (1905 bp)

CTCTCTCTCTTATCATTCATATTTTTCATATTTTCACCTATAACCAACCTTTCTACTCACTCACATACTAAACATG
GAAATTACCACTTTGTTTTTCTACTTTGCTTCTTTTCTCTTCATTGTTCTGTTCAAATCACTCATCAAAAACTTCT
TATTTCCTTCTAATGGAAAACAATTGCCTCTACCTCCTGGTTCTATGGGTTACCCTTACATAGGAGAAACCTTTC
AAATGTATTCTCAAGACCCTAGTCTTTTCTTTGCCAACAAAATCAAAAGGTATGGTGCTATGTTCAAGTCTCAC
ATTTTAGGTTGTCCTTGTGTGATGATTTCAAGTCCAGAAGCAGCAAAATTTGTGTTAAACAAATCTCAACTTTTC
AAACCAACATTTCCAGCTAGCAAAGAAAGGATGTTAGGGAAACAAGCAATTTTCTTTCATCAAGGAAATTATC
ATGCTAACCTAAGAAGACTTGTTCTTCGTTCTTTCATGCCTGAAGCCATCAAAAGCATTGTTCCTAATATTGAAT
CCATTGCACAAACTTGCCTCAAATCATGGGATGGAAATTTAATCACCACTTACCTTGAAATGAAAACATTCACC
TTCAACGTTGCACTTCTATCAATTTTTGGAAAAGATGAAATTCTATATAGAGAAGATCTAAAAAGATGTTACTA
CACACTTGAGAAAGGGTACAATTCAATGCCAATAAACCTACCAGGAACACTATTTCACAAGGCAATGAAAGCA
AGGAAAGAGCTTGCACAGATCTTAGAACAAATCATCTCAACAAGGAGGTGCAAAAAGCAAGTTTACAATGATT
TATTAGCTTCTTTCATGGATGAGAAAGCAGGACTTAGTGATGAACAAATATCAGATAATATCATTGGTGTTATT
TTTGCTGCTCGTGACACAACTGCTAGTGTGCTTACGTGGATTGTGAAGTACCTTGGTGAAAATCCTAGTGTCCT
TGAATCAGTCACAGAAGAACAAATGTCTATAATAAAGGGGAAACAAGAAAATGGTGAAGAAATTGGTCTAAA
TTGGGAAGACACAAAAAATATGCCAATAACTTCAAGGGTTATACAAGAAACTCTAAGAGTGGCATCAATTTTG
TCTTTTACATTTAGAGAAGCAACAGAAGATGTTGAATATCAAGGGTATCTTATACCAAAAGGATGGAAAGTAT
TGCCACTTTTCAGAAATATACATCACAGTCCAGAGAATTTCAAAGAGCCAGAAAAATTTGATCCTTCAAGATTT
GAGGTTGCTCCAAAACCTAATACTTTCATGCCATTTGGAAATGGGGTCCATGCATGTCCTGGCAATGAATTAGC
AAAGTTGGAGATTTTGGTTCTTGTACATCATCTAACCACAAAGTACAGGTGGTCTGTGGTCGGTGAAAAGAAC

GGAATTCAGTATGGTCCTTTTGCTCTTCCTCAAAATGGGTTACCAATCAACTTATATTCCAAGAAATAAAAAAA
TATGAACCAAACATAAAGATGGAGGCTGGTCAAATATAGCAAGGAATCAACTTTCTAAATTTGGAATGGTTTC
AAAAGTATGTTAATGAATTTGATTAAACTTTGACCAGATAAAGTTGTGAAGAGGAGAGACCATATAACAAATA
CCTAAACAAAGGGATATCAAACTTTATTCCCTTTAAATTTTGGCCAAGAGACACCCCAAAGGGGCAATTTTGAC
TTTTGAATTAATTGCACAAACTAGGAGTCAAGTGTACAGAGGTTACATTACATAGCCAGAGCTAAGCTAACAG
TGTAAATAACCTCTTTTCATTCATTTTTGTTTTTATTTTTTTGGTTCATAGTTTTTTTACATTTATTTTTTATTTTAG
GATATATTGAGGAAAAGTCCTCAATAGATTGGATTAGATGTAATGAAGTAACTAG

> *Triphysaria versicolor* TvCYP707A2-FL (1767 bp)

TTCTACTTCTATCTCTCTTATAACAATTCAATTACTCACACTAACATAAAAACATAAACATAAACATGGAACTA
AGTATCATGTTATGTTTCTTTACTTCTATTCTCTTCATTGTTCTGTTCAGAATATTCATCAAATCCTTTGTCTCAA
AAAGACATGACTTGCCACTCCCACCTGGTTCAATGGGTTGGCCTTACATAGGAGAAACTTTTCAACTTTATTCT
CAAGACCCTAATGTCTTCTTTGCATCAAAAATCAAAAGGTATGGTTCTATGTTCAAGTCTCACATTTTGGGATG
TCCATGTGTGATGATTTCAAGTCCTGAAGCAGCAAAATTTGTGCTGAATAAAGCTCAACTTTTCAAGCCAACAT
TCCCTGCTAGCAAAGAGAGGATGTTGGGAAAACAAGCTATCTTTTTTCATCAAGGAGAGTATCATGCTAATTTA
AGAAGACTTGTTCTTCGCACGTTCATGCCGGTAGCCATCAGAAACATTGTTCCTGACATTGAATCCATTGCTGA
AGATAGTCTTAAATCAATGGAAGGACGGTTAATCACCACTTTCCTTGAAATGAAAACGTTCACATTCAACGTTG
CTCTACTTTCAATTTTTGGAAAAGATGAAATTCACTACCGAGAGCAATTAAAACAGTGTTACTACACTCTAGAA
AAAGGGTACAATTCAATGCCAATTAATCTTCCAGGAACACTCTTCCATAAGGCAATGAAAGCTAGAAAAGAAC
TTGCACAGATCCTAGCTCAAATAATCTCAAGTAGAAGAGAGAAGAAAGAAGAATACAAAGATTTGTTAGGTTC
ATTCATGGATGAAAAATCAGGACTAAGTGATGAACAAATAGCAGATAATGTAATTGGAGTTATTTTTGCAGCT
CGTGATACCACAGCTAGTGTGCTTACGTGGATTGTTAAGTACCTTGGTGAAAATATCAGTGTCCTAGAATCAGT
GATTGAGGAACAAGAATCTATATTGAAGAGCAAAGAAGAAAATGGTGAAGAAAAGGGTCTTAATTGGGAAGA
TACAAAGAAAATGGTTATAACTTCAAGGGTTATTCAAGAGACTCTTAGAGTTGCTTCAATTTTGTCTTTCACTTT
TAGAGAAGCAGTTGAAGATGTTGAATATCAAGGGTATCTTATACCAAAAGGGTGGAAAGTATTGCCACTATTT
AGGAATATACATCATAGTCCAAATAACTTCAAAGATCCAGAAAAGTTTGATCCTTCAAGATTTGAGGCTGCCA
CAAAACCCAATACTTTTATGCCATTTGGCAGTGGGATCCACGCTTGTCCTGGCAATGAATTAGCCAAGATGGAG
ATTTTAGTCCTCTTACACCATCTGACCACAAAGTACAGGTGGTCTGTGGAGGGTACAAAGAATGGGATTCAAT
ATGGCCCTTTTGCTCTTCCCCAAAATGGATTGCCCATAACATTATATCCTAAGAAGTAGATAACACTTCAACAT
AAGATTGATCAGCCACACCATATTCTATAGAATCATTTTAAATATGGAAATAATGAATTCTTATCATTGTTCTC
AAAATTGGCTCTAACTCTCTCAACAAAATGAGGAAAGATCAAGACAATGTTGCAAGGGAGATTAGATCAACTC
TTGCTTTCTTTTTGGCCTATAGACACCCAAAGGGTAGTCTTGAGAATAGAACAGAAATAGGGATGGAGTTTGTC
AAGTGTATATAAGAGGTTTCATAGCAAGAGCAAATAGTTTGAGTAGGAAATGAAGGATTGTGCTATAAAGG

> *Triphysaria versicolor* TvCYP707A3-FL (1877bp)

ACCCCCTTCACCTTCATATCATCTCCTCATCATATATATAAACAAATCCAATTCTCATAATTTGACACTAGCAAC
AATGGATATCATCGTCTCCTTGTTTTACCTCTTTGCCTCCTTAATCTCCATATACATCATCCTCAATCTCATACTT
AAACTTATCTTCTCCTTTCACCATACTAAATTGCCTTTACCTCCTGGCACCATGGGCTATCCTTATATCGGCGAA
ACTTTTCAACTCTACTCCCAAAACCCAAATACTTTCTTTGCCTCCAAAGTCAAGAAGTATGGTTCTATATTCAAG
ACTCACATATTGGGCTGCCGGTGCGTGATGATATCAAGTCCAGAAGCAGTAAAATCAGTCCTTGTTACAAAAG
CCCATCTCTTCAAGCCTACATTCCCAGCTAGCAAAGAAATGATCCTCGGCAAACAAGCCATCTTTTTCGCCCAA
GGAGATTATCATGCCAATCTACGAAAGCTCGTTTTACGCACTTTGATGCCTCAATCGATCAAAACCCTTGTCCC
CGATATCGATTCCATCGCCATCACCCCTTGCAATCATGGGAAGGCAAATTAATCACCACTTATCAAGAAATGA
AAACATACACATTCAACGTGGCATTACTTTCTATATTTGGAAAGGATGAAGTTATGTACAACGAGGATTTAAA
GAGATGTTACTATAGTCTTGAAAAGGGGTATAATTCGATGGCGATTAATTTGCCGGGCACGCTTTTTCACAAGG
CAATGAAAGCTAGAAAAGCGTTAACACAAATCTTGGCTAAGATTGTATTGGTCAGACGGGCAAAGGATCATAA
ACACAATGATTTGCTTGGATCCTTTATGGCCGATACAGCCGGTTTGACCGATGAACAAATTGCGGATAATGTTA
TTGGGGTTATTTTTGCGGCTAGGGATACAACGGCTAGTGTTCTTACTTGGATTTTCAAGTACCTAGTTGAAAAT
CCATCTGTTTTGCAGGCTGTTACAGAAGAGCAAGAGTCATTGATTAAATCAAAAAAAGATAGTGGTGAAAATA
AGGGTTTGAATTGGGCAGACACAAAGAGGATGCCAATTACATCAAGGGTTATTATGGAAACTTTGAGAGTTGC
CTCTATTTTGTCTTTTACTTTCAGAGAAGCTGTTGAAGATGTTGAGTTTGATGATTATCTTATACCAAAAGGATG
GAAAGTGTTGCCACTCTTCAGGAATATTCACCACAGCCCAGATAATTTTGATGAGCCTCACAAATTTGATCCTT
CCAGATTTGAGGTGTTGCCCAAACCCAATACGTACCTACCATTTGGCAGTGGGACCCACGCTTGTCCGGGAAAT
GAGTTGGCTAAGCTGGAGATCCTGATTCTTGTTCACCATCTGACCACAAAGTACAGGTGGTCTATGATGGGCCC
ACGAAATGGTATTCAGTATGGGCCCTTTGCTCTTCCCCAGAATGGTCTGCCCATTAAGCTCTCTCTCAAATGAT
AAGTTGGCACTTGGCACTACAAAGCCCAATTTCTACATTTTTCCATTTACTTGGAGAATGTTGCAGTGAAAAGA
AAAAAGAGAAAAGCCTATTAGTGTACATGGAGTTTTTATTTGGGAGTATTTATTTTAAAGATGCTAGTTTTCAT
AGTAGGACAATGAGAGCCAAGAATCAGGCTTAATAACATGTAGTTAGGCTAAGTTGTTTTATTATTATTGTTAC
TTTTTGTTCTCTACGGAGTATGCTATTTTACGCATGTAAAAAGTCCGTAAGGCACGCGCAATTAATCAATAAAT
TTCTCTTCGAGTTGTTGCCAAATTATAACATGGGAATTACCACCATAGTATAATATATGTGAACTAATTCTCTGT
TACGCCACCAGTTGAAGAGACCCAGG

> *Orobanche cumana* OcCYP707A1-FL (1897bp)

GAAAATCCAACTTCCAAAAGAAAAATACCAACACTAAAAGCTAGCTACTGTAAAAGTTTCTCTTTATATCCTTA
ACAAAAAATCATGGAGTTCATCCTTTTCTCAGCAATATCCTTGATTTTCTCAGTCCTAATCCTCAATTTCATACT
TAAACTCTTCTCCTTTGGCCATGTAAGACTCCCTCTGCCTCCAGGCACCATGGGTTGGCCTTATATTGGTGAAAC
TTTTCAGCTCTACTCCCAAAACCCAAACACTTTCTTTACTTCCAAAGTCAAGAAGTATGGTTCCATATTCAAGA
CTCACATATTGGGATGCCGGTGTGTGATGATTTCAAGCCCAGAGGCAGCAAAACTTGTCCTCGTTTCAACAGCC
CATCTTTTCAAGCCCACGTTCCCAGCTAGCAAAGAGAGGATGCTAGGCAAACAAGCGATATTCTTCCATCAGG
GAGATTACCACGCCAAACTCAGAAAGCTCGTTCTGCGCGCATTCATGCCCGAATCCATCAAAAACACCGTTAC
GGACATCGAGTCCATAGCTCTTAGCTCATTGGAATCATGGGATGGCAAATTAATCACCACTTATCAAGAAATG
AAAACGTATACATTCAACGTGGCATTACTTTCTATATTTGGAAAGGATGAACTTTTATACAGAGAAGATCTCAA
GAGGTGTTACTACAATCTCGAAAAGGGATATAATTCGATGGCGATCAATATTCCGGGGACGCTTTTTCACAAG
GCCATGAAAGCTAGAAAGGAACTAGCACGGATCGTGGCTAAGATTCTATCACTTAGAAGGGAAAGGAAGCAA
CATCACACTGATCTGCTTGGATCCTTCATGGGGGATTCCGAGGGTTTGTCCGATGAACAAATTGCGGATAATAT
TATTGGTGTGATTTTTGCAGCCAGAGATACCACAGCTAGCGTTCTAACTTGGATCTTCAAGTACTTAGCTGAAA
ATCCAAATGTCTTGCAAGCTGTCACAGAAGAGCAACAAGCTTTGATAAATTTAAAAGAAGATTGTGGTGAAAA
GAAGGGTCTAAATTGGGCAGACACAAAGAAGATGCCTATCACAAAAAGGGTTATTCAAGAAACTCTCAGGGC
TGCATCTATTTTGTCTTTTACTTTCAGAGAAGCTGTCGAGGATGTTGAGTTTAATGGGTACCTCATTCCAAAAGG
ATGGAAAGTATTACCACTTTTCAGAAACATTCACCACAACCCAGATAATTTCCCCGAGCCTGAAAAATTTGATC
CTTCAAGATTTGAGGTTGCACCAAAGCCCAATACTTTCATCCCATTTGGCAATGGGACTCACTCATGCCCAGGA
AATGAGTTGGCCAAGCTGGAGATCCTAGTTCTTGTACACCATCTGACTACAAAGTACAAGTGGTCTATTATTGG
TTCACAAGATGGTATTCAGTACGGACCATTTGCTCTTCCTCAAAATGGTCTTCCCATTAAGCTCTCTATCAAAA
GCTAGTGGCCAACTTTTCATTTGTCAAATGAAGAAGAAGGAAAATTCTTGAGCTCATGAGAAGACTTACACGT
CAAATTTGCACTCAAGAAAGAATATGTTGATGCTTGTATTGAACGAGGAGAGAAGCAGGTTTGGGGTTGTTGA
CATCCTCAACGAGTCAGACGGTTCAATTACTACGCCATTTGGTGAACTAATTCGAAGGACAAATCCAATGTTGG
ATGGCGAGCTACAAGCAATTTCGTACGGTACCGTTGAAGAGAATATTCAATCCACATTGGTTGAATTGGGCTC
ACAATGTATATCGCAAGCAGTCACACATAATAGCGAGAATCTCAAGCGTCATTTGGCTTTCAGGAGTTGATAA
ATGCTGTAACTTAGCTTTTAAACGAATGTTGCTTTGTGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

> *Orobanche minor* OmCYP707A1-FL (1867bp)

GAAAATCCAACTTCCAAAAGAAAAATACCAACACTAAAAGCTAGCTACTGTAAAAGTTTCTCTTTATATCCTTA
ACAAAAAATCATGGAGTTCATCCTTTTCTCAGCAATATCCTTGATTTTCTCAGTCCTAATCCTCAATTTCATACT
TAAACTCTTCTCCTTTGGCCATGTAAGACTCCCTCTGCCTCCAGGCACCATGGGTTGGCCTTATATTGGTGAAAC
TTTTCAGCTCTACTCCCAAAACCCAAACACTTTCTTTACTTCCAAAGTCAAGAAGTATGGTTCCATATTCAAGA
CTCACATATTGGGATGCCGGTGTGTGATGATTTCAAGCCCAGAGGCAGCAAAACTTGTACTGGTTTCAAAAGC
CAATCTTTTCAAACCCACATTCCCAGCTAGCAAAGAGAGGATGCTAGGCAAACAAGCCATATTCTTCCATCAG
GGAGATTACCATGCCAAGCTCAGAAAGCTCGTTCTGCGCGCATTCATGCCCGAATCCATCAAAAGCACCGTTA
CGGACATCGAGTCCATAGCTCTTAGCTCATTGGAATCATGGGATGGCAAATTAATCACCACTTATCAAGAAAT
GAAAACGTATACATTCAACGTGGCATTACTTTCTATATTTGGAAAAGACGAAGTTTTGTACAGAGAAGATCTCA
AGAGGTGTTACTACAATCTCGAAAAGGGATATAATTCGATGGCGATCAATATTCCGGGGACGCTTTTTCACAA
GGCCATGAAAGCTAGAAAGGAACTAGCACGGATCGTGGCTAAGATTCTATCACTTAGAAGGGAAAGGAAGCA
ACATCACACTGATCTGCTTGGATCCTTCATGGGGGATTCCGAGGGTTTGTCCGATGAACAAATTGCGGATAATA
TTATTGGTGTGATTTTTGCTGCCAGAGATACCACAGCTAGTGTTCTAACTTGGATCTTGAAGTACTTAGCTGAA
AATCCAAATGTCTTGCAAGTTGTCACAGAAGAGCAACAAGCTTTGATAAATTTAAAAGAAGATTGTGGTGAAA
AGAATGGACTAAATTGGGCTGACACAAAGAAGATGCCTATCACAAAAAGGGTTATTCAAGAAACCCTGAGGG
CTGCATCTATTTTGTCTTTTACTTTCAGAGAAGCTGTCGAGGATGTCGAGTTTAACGGGTACCTCATTCCAAAA
GGATGGAAAGTATTACCACTTTTCAGAAATATTCACCACAACCCGGATAATTTTCCCGAGCCTGAAAAATTTGA
TCCTTCAAGATTTGAGGTTGCACCAAAGCCCAATACTTTCATCCCATTTGGCAATGGGACTCACTCATGTCCAG
GGAATGAGTTGGCCAAGTTGGAGATCCTAGTTCTTATACACCATTTGACTACAAAGTATAAATGGTCTATTATT
GGTTCACAAGATGGTATTCAGTACGGACCATTTGCTCTTCCTCAAAATGGTCTTCCCATTAAACTCTCTCTCAAA
AGCTAGTGGCCAACTTTTCATTTGTCAAATGAAGAAGGAAAATTCTTGAGCTCATGAGAAAGAATATGTTGAT
GCTTGTATTAAACGCGAAGAGAAGCAGGTTTGGTATGGTTGACGTCCTCAATGGTTCAGTTATGACGTCATTTG
GTGAAAGGACAAATTTAATGCTGGATGGCGAGCATATTCATTCTGTATTGGTTGAATTGGGCTCGCTTTGTCTA
TCGCAAGTAGTCACACATAATAGCTAGAATTTCAAGGACGATGGATAAGCGTCATTTGGCTTTCACAAGTTGAT
CTTACAACGGTTGCAAAATGATGTAACTTAGTTTTATAATTCTTTAAATGAATGTCACTTTTTGTTGTAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

> *Striga hermonthica* ShCYP707A1-FL (1679bp)

AACAAAACATGGATTTCATCTCCCTTTGTTTCCTTCTTGCATCCTTAACAATCTCCTTCATTTTCATCATCCTCAA
ATTTCTACGGCTCGGCCGGTCCAAGTTGCCTTTGCCACCGGGCACTATGGGCTGGCCGTACGTAGGCGAAACGT
ACCAACTCTACTCCCAAAACCCGAACACTTTCTTCGCTTCCAAAGTCAAGAAGTACGGCGCCATATTCAAGAGC
CACATATTGGGCTGCCCGTGCGTGATGATATCGAGCCCAGAGGCCGCTAAGATGGTCCTTGTCTCGAGAGCCC
ATCTTTTCAAGCCCACATTCCCGGCTAGCAAAGAGCGCATGCTCGGAAAACAAGCCATATTTTTCCACCAAGG
AGACTATCACGCCAAGCTCAGAAAGCTCGTCTCGCGCGCTTTCATGCCCGATTCCATCAAAGCCGTGATCCCGA

ATATCGAGTCCTTTGCCTTAAGTTCCTTAGAGTCTTGGGAAGATAGACTAATCACTACTTATCAAGAAATGAAA
GCATACACATTCAAAGTGGCACTGCTTTCAATATTCGGAAAAGACGAGGTTTTGTACCGGGAGGATCTCAAGC
GGTGCTATTATGAGCTCGAGAAGGGTTACAACTCGATGGCGGTTAATCTCCCGGGCACGCTTTTCTACAAGGCA
ATGAGGGCCCGAAAGGAGATGGCGAAAATCTTGGCGAACATTCTAACTCTAAGAAGGGAAATGAAGCAAAGC
CATAGTGACTTGCTCGGGTCATTCATGGAGGATTCCGAGGGTCTCTCGGACGAGCAAATCGCGGATAATGTCA
TCGGAGTTATTTTCGCGGCTCGAGACACGACCTCAAGTATCTTAACTTGGATCTTGAAGTTCTTGGCCGAAAAT
CCGAGCGTTTTGGAAGCTGTCACGGAAGAGCAAGAGGCTTTGATAAAATGGAAGGAGGATTGTGGGGAGAGT
TGTGGTTTGAGTTGGGCAGACACAAAGAGAATGCCTAAAACATCAAGAGTTATTCAAGAAACTCTAAGAGTTG
CCTCTATTTTGTCCTTTACTTTTAGAGAGGCTGTTGAAGATGTTGAGTTTGAAGGATATCTAATTCCAAAAGGAT
GGAAAGTACTGCCACTCTTTAGGAACATTCATCACAACCCAAATCATTTCTTGGAGCCTGAAAAATTTAATCCT
TCAAGATTTGAGGTGGCACCCAAGCCAAATACCTTCATGCCATTTGGCAGTGGGTCCCACTCATGCCCAGGGA
ATGAGCTGGCCAAGGTGGAGATCCTTGTCCTTTTGCATCATCTGACCACAAAGTACAGATGGGCTGTGGTGGG
CCCACAAGATGGCATCCAGTATGGGCCCTTCCCCCTCCCCAAGAATGGGCTTCCCATTGAGCTCTCCCTCAAAA
AATAGAAAATGATTACAAGATTCATAAAAAAAAAGTATAAAATAATAGAGAAAGAAGCCCAATTTCACTGTG
GAAAGAGAAAAAAAAAAGACTTTTTTGGTGCAAAGCAAAGCAAAGCAAGGGAAATCAAGCAAGTTATGCATA
TAGAGATTTGGTTTTTATTTAGATGTTATTTATGTTAATAGGATGAAAACTTCAATGTAATAGCATTTAGTTAGG
TCTTTTTTTTTTGTGTTATTTCTCTTGTCTCTTTTTTTTTTTTTATGTCTGTAAAAAGTCCG

> *Striga hermonthica* ShCYP707A2-FL (1460 bp)

ACTCCGAAAGCTAGTAACACTCATCCCACACAAACCCAAAATCCAACAATGGAGTTCATCTCTTTGTTTTACCT
TCTAGCAACCTTAACATCCTCACTCTTCATCGTAAAATTTATCCGGTCGGGTCGGGCCAAATTGCCCCTCCCTCC
CGGCACGATGGGCTGGCCGTACGTCGGCGAGACCTACCAACTCTACTCCCAAAACCCGAACACTTTCTTCGCCT
CGAAAGTCAAGAAATATGGTTCGATATTCAAGAGCCACATACTCGGCTGCCCGTGCGTGATGGTCTCGAGCCC
GGAGGCTGCAAAGATGGTCCTCGCCTCGAAAGCCCATCTCTTCAAGCCCACATTCCCGGCTAGCAAAGAGAGA
ATGCTTGGCAAACAAGCGATATTTTTCCACCAAGGGGATTATCACGCCAAGCTCCGAAAGCTCGTTTTACGCGC
TTTCATGCCCGAGTCCATCAAAGACATGATCCCGAGTATCGAGTCCATTGCTCTCGGCTCCCTGGTGTCTTGGG
AAGATAGACTAATCACCACCTATCAAGAAATGAAGACATACACTTTCAACGTGGCGTTGCTTTCGATATTCGG
AAAAGATGAGATTCTTTACCGGGAGGATCTCAAGAGGTGCTATCACGAAGTCGAAAAAGGTTACAACTCGATG
GCGGTTAACTTGCCGGGCACGCTTTTCCACAAGGCAATGAAGGCCCGTAACGAGTTGGCGAAAATGCTCGCCA
AGATTATAACCGTGAGGAGAGAAATGAAGCAGAGCTATAACGATTTGCTCGGGTCCTTCATGGGGGATAACGA
GGGCTTGTCGGACGAGCAGATTGCCGACAATATTATCGGCGTTATTTTCGCGGCACGCGACACGACCGCTAGT
GTTCTCACTTGGATCTTAAAGTTCTTGGCCGAAAATCCGAGCGTCTTGGAAGCCGTCACGGAAGAGCAAGAGG
CTTTGATAAGATCAAAGGAGGAGTGTGGGGAGAGTAAGGGCTTGAGCTGGGCAGATACAAAGAGAATGACTA
AAACAGTTAGGGTTATTCAAGAAACTCTAAGAGTTGCCTCAATTTTGTCCTTTACTTTCAGAGAGGCTGTTGAA
GATGTTGAGTTTGATGGATATCTTATTCCAAAAGGATGGAAAGTGTTGCCACTCTTTAGGAACATTCACCATAA
CCCAAATCATTTCTTGGAGCCTGCAAAATTTGATCCTTCAAGGTTTGAGGTGACACCTAAGCCCAATACTTTCA
TGCCATTTGGCAACGGGTCCCACGCGTGCCCGGGGAATGAGCTCGCCAAGCTGGAGATCCTGGTTCTTTTGCAT
CACCTGACCACAAAGTACAGGTGGACTGTGGTGGGCCCACAAGATGGCATTCAGTATGGGCCCTTTGCCCTTC
CACAAAAAGGCCTGCCCATTGAGCTAACTCTCAAAGAATAGACAATGAAGAGTAAAAAAAAAAA

Études des mécanismes impliqués dans la perception des stimulants de germination menant à la germination des plantes parasites des genres *Orobanche* et *Phelipanche*

La germination des graines d'orobanche est adaptée à leur mode de vie parasitaire et constitue une étape clé du cycle de développement de ces phytopathogènes. Cette germination particulière se déroule en deux phases distinctes, le conditionnement et la stimulation. Tandis que le conditionnement, sous contrôle abiotique, permet l'acquisition de la sensibilité aux stimulants de germination (SG -principalement des strigolactones- SL), la stimulation, sous contrôle biotique, permet l'achèvement de la germination après perception de SG émis par la plante hôte. Ce travail, d'abord mené chez *Phelipanche ramosa*, a permis de mettre en évidence l'induction SL-dépendante d'un gène clé, *PrCYP707A1*, codant une enzyme de catabolisme de l'acide abscissique (ABA). Le catabolisme de cette phytohormone entraine la levée de dormance et permet l'achèvement de la germination. Cette voie de transduction des SL menant à l'induction de ce gène a été démontrée dépendante du protéasome 26S, d'une protéine homologue à MAX2, et de protéines α/β hydrolases. Chez les plantes parasites des genres *Striga* et *Orobanche* l'induction SG-dépendante d'un gène *CYP707A* est conservée. De même, chez *Arabidopsis thaliana,* le gène *AtCYP707A3* est induit par les SL dans la germination. Ces résultats mettent en évidence une levée de dormance SL-dépendante *via* le catabolisme de l'ABA. Enfin, au cours du conditionnement, l'induction du gène *PrCYP707A1* par les SG est démontrée comme étant sous contrôle d'un processus épigénétique. En effet, une déméthylation de cytosines de l'ADN est nécessaire à l'acquisition de la sensibilité aux SG. Celles-ci ont notamment été mises en évidence au niveau du promoteur du gène *PrCYP707A1*.

Mots clés : Strigolactones, germination, dormance des graines, *Phelipanche ramosa*, acide abscissique, épigénétisme.

Studies of mechanisms involved in the perception of germination stimulants leading to the germination of parasitic plants belonging to *Orobanche* and *Phelipanche* genus

Seed germination of broomrapes is adapted to their parasitic lifestyle and is a key step in the development cycle of these plant pathogens. This particular germination is the result of two distinct processes, conditioning and stimulation. While conditioning is under abiotic control and allows the acquisition of sensitivity to germination stimulants (GS-mainly strigolactones-SL), stimulation is under biotic control and allows the completion of germination after perception of GS produced by the host plant. This work highlights the SL-dependent induction of *PrCYP707A1* expression, a key gene encoding an abscisic acid (ABA) catabolic enzyme in *Phelipanche ramosa*. Catabolism of this plant hormone leads in turn to dormancy breakdown and thus allows the completion of germination. Induction of PrCYP707A1 gene expression after GR24 treatment is shown to be on the 26S proteasom, a protein homologous to MAX2, and α/β hydrolase proteins. In parasitic plants of genus *Striga* and *Orobanche* GS-dependent induction of *CYP707A1* gene is conserved. Similarly, in *Arabidopsis thaliana*, *AtCYP707A3* gene is induced by SL during germination. These results highlight a common SL-dependent dormancy breakdown process by the ABA catabolism. This work also demonstrate that during the conditioning period, *PrCYP707A1* gene induction by GS is under the control of an epigenetic process. Indeed, demethylation of DNA is required in *P. ramosa* seeds for the acquisition of the ability to germinate in response to GS. These demethylations have been especially highlighted in the *PrCYP707A1* gene promoter.

Key words: Strigolactones, seed germination, seed dormancy, *Phelipanche ramosa*, abscisic acid, epigenetic.

l'université nantes angers le mans
PÔLE DE RECHERCHE ET D'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR

UNIVERSITÉ DE NANTES

Thèse de Doctorat

Marc-Marie LECHAT

Études des mécanismes impliqués dans la perception des molécules stimulant la germination des plantes parasites des genres *Orobanche* et *Phelipanche*.

Studies of mechanisms involved in the perception of molecules leading to the germination of parasitic plants belonging to *Orobanche* and *Phelipanche* genus

Résumé

La germination des graines d'orobanche est adaptée à leur mode de vie parasitaire et constitue une étape clé du cycle de leur développement. Cette germination particulière se déroule en deux phases distinctes, le conditionnement et la stimulation. Tandis que le conditionnement, sous contrôle abiotique, permet l'acquisition de la sensibilité aux stimulants de germination (SG), la stimulation, sous contrôle biotique, permet l'achèvement de la germination après perception de SG émis par la plante hôte, essentiellement des strigolactones (SL). Cette étude, d'abord menée chez *Phelipanche ramosa*, a permis de mettre en évidence l'induction SL-dépendante d'un gène clé, *PrCYP707A1*, codant une enzyme de catabolisme de l'acide abscissique (ABA). Le catabolisme de cette phytohormone entraine la levée de dormance et permet alors l'achèvement de la germination. Il a été démontré d'autre part que la voie de transduction des SL menant à l'induction de ce gène est dépendante de protéines α/β hydrolases, d'une protéine homologue à MAX2, ainsi que du protéasome 26S. Plus largement, chez les plantes parasites des genres *Striga* et *Orobanche* l'induction SG-dépendante d'un gène *CYP707A* est aussi conservée. De même, chez *Arabidopsis thaliana,* le gène *AtCYP707A3* est induit par les SL lors de la germination. Au cours du conditionnement, l'induction du gène *PrCYP707A1* par les SG a été démontrée comme étant sous le contrôle d'un processus épigénétique. En effet, une déméthylation des cytosines de l'ADN, notamment au niveau du promoteur du gène *PrCYP707A1*, est nécessaire à l'acquisition de la sensibilité aux SG.

Mots clés

Strigolactones, germination, dormance des graines, Phelipanche ramosa, acide abscissique, épigénétique

Abstract

Seed germination of broomrapes is adapted to their parasitic lifestyle and is a key step in their development cycle. This particular germination is the result of two distinct processes, conditioning and stimulation. While conditioning is under abiotic control and allows the acquisition of sensitivity to germination stimulants (GS), stimulation is under biotic control and allows the completion of germination after perception of GS produced by the host plant, mainly strigolactones (SL). This work highlights the SL-dependent induction of *PrCYP707A1* expression, a key gene encoding an abscisic acid (ABA) catabolic enzyme in *Phelipanche ramosa*. Catabolism of this plant hormone leads to dormancy breakdown and thus allows the completion of germination. Sl pathway leading to *PrCYP707A1* induction involved α/β hydrolase proteins, a protein homologous to MAX.2, and the 26S proteasom. More generally, in parasitic plants from *Striga* and *Orobanche* genus, GS-dependent induction of *CYP707A1* gene was also conserved. Similarly, in *Arabidopsis thaliana*, *AtCYP707A3* gene was induced by SL during germination. These results highlight a common SL-dependent dormancy breakdown process by the ABA catabolism. This work also demonstrated that during the conditioning period, *PrCYP707A1* gene induction by GS was under the control of an epigenetic process. Indeed, demethylation of cytosine from DNA, especially in the *PrCYP707A1* promoter, is required for the acquisition of GS sensitivity in *P. ramosa* seeds.

Key Words

Strigolactones, seed germination, seed dormancy, Phelipanche ramosa, abscissic acid, epigenetics

L'université Nantes Angers Le Mans