ACADEMIE DE MONTPELLIER
UNIVERSITE MONTPELLIER II
SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC

T H E S E

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE MONTPELLIER II

Discipline : Amélioration des plantes
Formation Doctorale : Développement et adaptation des plantes : biologie moléculaire et intégrative
Ecole Doctorale 167 : Biologie des Systèmes Intégrés – Agronomie – Environnement

présentée et soutenue publiquement

par

KUSWANHADI

Le 18 Décembre 2006

Isolement et caractérisation des gènes *ACS* et *ACO* impliqués dans la biosynthèse de l'éthylène chez *Hevea brasiliensis*

JURY

M. James TREGEAR	(UMR-BEPC, IRD, Montpellier)	Directeur de Thèse
M.Jean-Claude PECH	(ENSA, Toulouse)	Rapporteur
M. Gilles PILATE	(INRA, Orléans)	Rapporteur
M. Pascal GANTET	(Professeur, Université Montpellier II)	Examinateur
M. Soulaiman SAKR	(UMR-PIAF, Univ.Blaise Pascal, Clermont-Ferrand)	Examinateur
M. Pascal MONTORO	(UMR-BEPC, CIRAD, Montpellier)	Examinateur

ACADEMIE DE MONTPELLIER
UNIVERSITE MONTPELLIER II
SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE MONTPELLIER II

Discipline : Amélioration des plantes
Formation Doctorale : Développement et adaptation des plantes : biologie moléculaire et intégrative
Ecole Doctorale 167 : Biologie des Systèmes Intégrés – Agronomie – Environnement

présentée et soutenue publiquement

par

KUSWANHADI

Le 18 Décembre 2006

Isolement et caractérisation des gènes *ACS* et *ACO* impliqués dans la biosynthèse de l'éthylène chez *Hevea brasiliensis*

JURY

M. James TREGEAR	(UMR-BEPC, IRD, Montpellier)	Directeur de Thèse
M.Jean-Claude PECH	(ENSA, Toulouse)	Rapporteur
M. Gilles PILATE	(INRA, Orléans)	Rapporteur
M. Pascal GANTET	(Professeur, Université Montpellier II)	Examinateur
M. Soulaiman SAKR	(UMR-PIAF, Univ.Blaise Pascal, Clermont-Ferrand)	Examinateur
M. Pascal MONTORO	(UMR-BEPC, CIRAD, Montpellier)	Examinateur

REMERCIEMENTS

Je voudrais remercier avant tout l'Ambassade de France en Indonésie, et plus particulièrement le Service de la coopération scientifique et culturelle ainsi que le CROUS de Montpellier d'avoir soutenu financièrement mes études pendant 3 années de thèse.

Ce travail a été réalisé au sein du groupe hévéa de l'équipe *Biotechnologies et génomiques des plantes tropicales* (UMR-1098) et dans le laboratoire de l'UMR-PIA. Aussi, je tiens à remercier pour leur accueil les directeurs de ces unités mixtes de recherche respectivement Madame le Pr. Françoise DOSBA et Monsieur Jean-Christophe GLASZMANN.

La thèse a été encadrée par le Dr. James TREGEAR, directeur de thèse, et par le Dr. Pascal MONTORO, co-directeur de thèse. Je tiens à les remercier pour leur aide, leur disponibilité et leur encadrement au cours de ce travail.

Je remercie le Pr. Jean-Claude PECH de l'ENSA de Toulouse et le Dr. Gilles PILATE de l'INRA Orléans d'avoir accepté de juger ce travail en tant que rapporteurs.

Je remercie le Pr. Pascal GANTET de l'Université Montpellier II et le Dr. Soulaiman SAKR de l'Université Blaise PASCAL de Clermont Ferrand d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Je remercie la direction scientifique du CIRAD d'avoir financer la prolongation de la thèse en 2006. Mes remerciements s'adressent également à Messieurs Jérôme SAINT-BEUVE, Gabriel de TAFFIN et Jean-Guy BERTAULT, représentant du CIRAD à Jakarta, et Michel DELABARRE.

Je remercie le directeur de l'IRRI ainsi que le directeur du centre de recherche de Sembawa (Sumatra) de m'avoir soutenu financièrement et matériellement lors de cette thèse.

Je remercie le Dr Jean-Luc VERDEIL de m'avoir permis de travailler sur le plateau technique d'imagerie végétale de l'UMR-1098.

Je remercie le Dr. Marie Noëlle DUCAMP-COLLIN et Monsieur Marc LEBRUN de m'avoir permis de faire des dosages de l'éthylène au sein du laboratoire de l'UPR Qualité des Aliments Tropicaux.

Je remercie le Dr. Régis LACOTE, le Dr. Valérie PUJADE-RENAUD, le Dr. Julie LECLERCQ, le Dr. Laurence ALEMANNO, Mme Anne-Clément VIDAL pour leur aide et leurs conseils ainsi que leur participation au comité de ma thèse.
Je tiens à remercier M. Gérald OLIVER, ainsi que Mesdames Maryannick RIO, Florence DESSAILLY, Florence MARTIN et Christine SANIER de leur appui technique. Mes remerciements s'adressent également à Mme Florence CHAZOT pour ces aides précieuses lors des démarches administratives.

Mes remerciements s'adressent également à tous les collègues étudiants et stagiaires, particulièrement Benjamin MARTEAU, Cécile LEFRANCOIS, Claire GUILLAUMON et Virginie GEBELIN, qui ont participé à la réalisation de ce travail.

Je remercie mes collègues indonésiens, Dr. SISWANTO, Dr. SUMARMADJI et Mr Radite TRISTAMA de leur soutien.

Je veux enfin remercier mon épouse Mme Mudji LASMININGSIH et mes filles Rosanna, Roseanni, Rosyanne et Rosika ainsi que mes parents dont le soutien fut très important lors des périodes difficiles.

SOMMAIRE

1 INTRODUCTION 12
1.1 Hévéaculture & *Hevea brasiliensis* 13
1.2 Problématique de la production de latex 15
1.3 Problématique indonésienne 16
1.4 Exploitation de l'hévéa & production de latex 17
1.4.1 Récolte du latex 17
1.4.2 Effets de la stimulation par l'éthéphon 18
1.4.3 Stimulation pour des systèmes à faible fréquence de saignée 19
1.4.4 Du concept d'écoulement prolongée vers la sur-stimulation en fin d'exploitation 19
1.4.5 Mode d'action des stimulants 20
1.5 Ethylène chez les végétaux 23
1.5.1 Biosynthèse de l'éthylène 23
1.5.2 Signalisation éthylène 32
1.6 Action de l'éthylene chez *Hevea brasiliensis* 35
1.6.1 Découverte de l'action de l'éthylène sur la production de latex 35
1.6.2 Rôle de l'éthylène sur le fonctionnement des cellules laticifères 38
1.6.3 Quel modèle pour étudier la réponse aux stress d'exploitation ? 38
1.6.4 Objectifs du projet de thèse 39

2 MATERIEL ET METHODES 40
2.1 Matériel végétal 41
2.2 Extraction d'ADN 41
2.3 Extraction des ARN totaux et synthèse des aDN complementaires 42
2.4 clonage et séquençage d'ADN complémentaires 42
2.5 Isolement des clones pleines longueurs 45
2.5.1 Criblage de banques phagiques d'ADNc 45
2.5.2 Extension des fragments partiels par RACE-PCR 45
2.6 Etude de l'accumulation des ARN messagers par RT-PCR semi-quantitative 47
2.7 Conception d'un caisson pour l'application des traitements gazeux et caractérisation des effets induits 48
2.8 Dosage d'ACC 52
2.8.1 Méthode de dosage de l'ACC 52
2.8.2 Dosage d'ACC dans les écorces et les feuilles 52
2.9 Dosage d'éthylène 53
2.10 Impact des traitements Ethrel et blessure sur la sénescence 53
2.11 Histo-cytologie 54
2.11.1 Fixation 54
2.11.2 Caractérisation histologique des tiges à différents stades de développement 54
2.12 Hybridation *in situ* 55
2.12.1 Préparation des coupes histologiques 56
2.12.2 Synthèse des sondes ARN marquées à la DIG 56
2.12.3 Histo-hybridation 58

3 ISOLEMENT ET CARACTERISATION DES GENES CODANT L'ACC SYNTHASE 60
3.1 Isolement des séquences partielles 61
3.2 Isolement des clones pleines longueurs 61
3.2.1 Criblage de banques phagiques d'ADNc 61
3.2.2 Extension des extrémités 5' et 3' des séquences partielles d'ADNc par RACE-PCR 64
3.2.3 Isolement et caractérisation d'un fragment génomique pour D10 64

3.3 Analyse *in silico* des séquences isolées 64
3.3.1 Structure du gène *HbACS-D10* 64
3.3.2 Trois membres potentiels de la famille multigénique codant les ACS chez *H. brasiliensis* 65
3.3.3 Analyse phylogénique des séquences *ACS* 66
3.3.4 Structure des ACC synthases et identification des acides aminés critiques pour la fonction enzymatique 66
3.4 Régulation de l'expression du gène *HbACS-D10* codant une ACC synthase 71
3.4.1 Effet de la stimulation par l'éthylène 71
3.4.2 Effet d'un inhibiteur de l'action de l'éthylène 71
3.4.3 Effet de la blessure 71
3.5 Discussion et conclusion sur la caractérisation des gènes *ACS chez H. brasiliensis* 76

4 ISOLEMENT ET CARACTERISATION DES GENES CODANT L'ACC OXYDASE 78
4.1 Isolement des ADN_c et des gènes pleines longueurs 79
4.1.1 Isolement des séquences partielles 79
4.1.2 Isolement d'un clone pleine longueur par criblage des banques phagiques d'ADNc 79
4.1.3 Extension des extrémités 5' et 3' des clones partiels d'ADNc par RACE-PCR 82
4.1.4 Isolement des séquences ADNc et génomiques pleines longueurs 82
4.1.5 Evaluation du nombre de gènes *ACO* chez *H. brasiliensis* 84
4.1.6 Analyse *in silico* des séquences pleines longueurs isolées 84
4.1.7 Analyse phylogénique 87
4.1.8 Structure des protéines et identification des résidus d'acides aminés critiques pour la fonction enzymatique 90
4.2 Caractérisation de l'expression des gènes *ACO* chez *H. brasiliensis* 96
4.2.1 Caractérisation de l'expression des 3 gènes *HbACO* au cours du développement 97
4.2.2 Localisation de l'expression des gènes *HbACO* par hybridation *in situ* 105
4.3 Discussion et conclusion sur la caractérisation des gènes *ACO* chez *H. brasiliensis* 109

5 DISCUSSION GENERALE 112
5.1 Gènes de biosynthèse de l'éthylène chez l'hévéa 113
5.1.1 Plusieurs membres pour les familles multigéniques codant l'ACS et l'ACO chez *H. brasiliensis* 113
5.1.2 Proposition d'une classification des gènes *HbACS* et *HbACO* 114
5.2 Régulation de la production d'éthylène au cours du développement 115
5.3 Les plants immatures greffés, un modèle pour étudier la réponse aux stress éthylénique et blessure 116
5.4 Régulation de la production d'éthylène chez des plants immatures d'hévéa en réponse aux stress 117
5.4.1 Les systèmes de production de l'éthylène chez l'hévéa 117
5.4.2 Régulation des gènes *ACS* en réponse aux stress 120
5.4.3 Régulation des gènes *ACO* en réponse aux stress 120
5.5 Interaction éthylène / blessure sur la production d'éthylène et sa signalisation chez l'hévéa 121

6 CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES 123

7 BIBLIOGRAPHIE 127

FIGURES

Figure 1. Tendances de la consommation mondiale en caoutchouc jusqu'en 2035 (Budiman, 2005).... 14
Figure 2. Régions avec un climat favorable (en vert) pour l'hévéaculture en Indonésie (Wijaya, 2005). 14
Figure 3. Anatomie de l'écorce chez *Hevea brasiliensis* (Gomez, 1983)..... 21
Figure 4. Etapes principales impliquées dans la biosynthèse du caoutchouc naturel chez *Hevea brasiliensis* (Moir, 1969)..... 22
Figure 5. Schéma de l'action de l'éthylène sur la stimulation de la production de latex d'après Hashim (Hashim, 1989)..... 24
Figure 6. Voie de biosynthèse de l'éthylène et autres voies métaboliques reliées (Mathooko *et al.*, 1999) 28
Figure 7. Structure tertiaire du complexe Fe(II)ACCO·ACC·O2 et mécanisme catalytique..... 34
Figure 8. Représentation de la voie de transduction du signal éthylénique (Alonso & Stepanova, 2004) 36
Figure 9. Modèle simplifié représentant l'induction de la voie de biosynthèse de l'éthylène et la voie perception-signalisation en aval (Ecker, 2004)..... 37
Figure 10. Caisson étanche utilisé pour l'application des traitements gazeux..... 50
Figure 11. Symptômes observés au cours de la stimulation éthylénique..... 57
Figure 12. Structure de la séquence génomique de *HbACS-D10* et de la protéine codée par ce gène. ... 68
Figure 13. Hybridation moléculaire de type *Southern* d'une sonde dérivée de la partie codante du gène *HbACS-D10*, sur de l'ADN génomique de 3 clones de *H. brasiliensis* (RRIM 600, PB 260, PB 217). Pour chacun des clones, 8µg d'ADN génomique ont été clivés par différentes enzymes de restriction (*Eco*RI, *Eco*RV, KpnI, SacI, BamHI, XbaI)..... 69
Figure 14 Comparaison des régions 3' terminales codées par les 3 ADNc *HbACS* isolés (D10, F13 et F10)..... 70
Figure 15. Dendogramme illustrant la conservation de séquences protéiques entre HbACS-D10 et les protéines codées par la famille multigénique *ACS* chez *L. esculentum*..... 72
Figure 16. Dendogramme illustrant la conservation de séquences protéiques entre HbACS-D10 et les protéines codées par la famille multigénique *ACS* chez *Arabidopsis thaliana*..... 72
Figure 17. Comparaison des régions C-terminales des séquences protéiques codées par les gènes *HbACS* avec celles d'autres espèces..... 73
Figure 18. Effet de la stimulation éthylénique (1 ppm d'éthylène) sur l'accumulation de transcrits de *HbACS-D10* dans les feuilles et des écorces de jeunes plants greffés PB 260..... 75
Figure 19. Effet du 1-MCP sur l'accumulation de transcrits de *HbACS-D10* dans les écorces et les feuilles..... 75
Figure 20. Effet de la blessure sur l'accumulation de transcrits d'*HbACS-D10* dans les feuilles et les écorces..... 75
Figure 21. Structure des gènes *HbACO-H4* et *HbACO-H5*..... 85
Figure 22. Hybridation moléculaire de type *Southern* d'une sonde correspondant à la partie codante du gène *HbACO-O48* sur de l'ADN génomique de 3 clones d'*H. brasiliensis* (RRIM 600, PB 260, PB 217)..... 86
Figure 23. Structure de la séquence génomique de *HbACO-H4* et de la protéine codée par ce gène. 88
Figure 24. Structure de la séquence génomique de *HbACO-H5* et de la protéine codée par ce gène. 89
Figure 25. Comparaison des structures des gènes *HbACO* avec celles d'autres espèces..... 91
Figure 26. Dendogramme illustrant la conservation de séquences entre les ACO d'*Hevea brasiliensis* et les ACO d'autres espèces végétales..... 92
Figure 27. Alignement des séquences peptidiques HbACO du clone PB 260 avec celle du clone RRIM600 (N° accession AAP41850)..... 93
Figure 28. Mise en évidence des motifs impliqués dans l'activité catalytique par alignement des séquences peptidiques HbACO, PhACO1, MdACO1, AtANS et An-IPNS..... 95

Figure 29. Analyse en conditions saturantes par RT-PCR semi-quantitative (35 cycles) de l'expression des gènes *ACO* dans différents organes en réponse à la stimulation éthylénique et au cours du développement chez *Hevea brasiliensis.* 98
Figure 30. Analyse par RT-PCR semi-quantitative en conditions non saturantes de l'expression des gènes *ACO* dans différents organes en réponse à la stimulation éthylénique et au cours du développement chez *Hevea brasiliensis.* 98
Figure 31. Effet de la stimulation à l'Ethrel sur l'expression des gènes *HbACO* dans les écorces et les feuilles de jeunes plants greffés PB 260. 100
Figure 32. Effet du caisson et du pré-traitement au 1-MPC (1-méthylcyclopropène) avant la stimulation à l'éthylène sur l'expression des gènes *ACO* dans les écorces et les feuilles de jeunes plants greffés PB 260..... 103
Figure 33. Effet de la stimulation à l'éthylène sur l'expression des gènes *ACO* dans les écorces et les feuilles de jeunes plants greffés PB 260. 104
Figure 34. Effet de la blessure sur l'expression des gènes *ACO* dans les écorces et les feuilles de jeunes plants greffés PB 260. Analyse par RT-PCR semi-quantitative. 104
Figure 35. Hybridation *in situ* des ARNm d'*HbACO-H5 et HbACO-O4.8* sur des coupes transversales de l'écorce de rejet et de plantules somatiques. 108
Figure 36. Schéma récapitulatif des données d'expression des gènes *ACS* et *ACO* chez *Hevea brasiliensis.* 119
Figure 37. Modèle de travail présentant l'influence de la stimulation éthylènique et de la blessure sur la régulation de la biosynthèse d'éthylène et la réponse à l'éthylène au niveau moléculaire, cellulaire et *in planta* (écoulement et régéneration du latex, abscission et sénescence foliaire) chez *Hevea brasiliensis.* 126

TABLEAUX

Tableau 1. Données économiques de l'hévéaculture en Indonésie 16
Tableau 2. Résumé des acides aminés les plus importants pour la fonction et la structure de la protéine ACS chez *Lycopersicum esculentum.* 29
Tableau 3. Liste non exhaustive des espèces pour lesquelles des gènes codant l'ACC oxydase ont été isolés 30
Tableau 4. Liste des amorces dégénérées définies à partir de régions conservées au niveau de la séquence codante en vue d'amplification d'ADNc et d'ADNg des gènes *ACS* et *ACO* chez *H. brasiliensis.* 43
Tableau 5. Liste des amorces spécifiques définies à partir des séquences partielles des gènes *ACS* et *ACO* chez *H. brasiliensis* 44
Tableau 6. Amorces spécifiques définies à partir des séquences partielles pour l'extension de ces fragments en 5' et en 3' par la technique de RACE- PCR 46
Tableau 7 . Amorces utilisées pour l'amplification des ADNc et ADNg pleines longuers (Amorces aux extrimité 5' et 3') 46
Tableau 8. Amorces utilisées pour l'amplification par RT-PCR semiquantitative 48
Tableau 9. Effet du caisson, du terreau, de la plante et de l'éthylène sur la concentration en gaz (C_2H_4 ; O_2 ; CO_2) dans le caisson de culture 51
Tableau 10. Concentration en ACC mesurée dans des écorces et des feuilles traitées avec de 1 ppm d'éthylène. Trois mesures ont été réalisées par traitement. Les concentrations en ACC sont obtenues par un dosage indirect de l'éthylène par la méthode non enzymatique de Lizada et Yang (Lizada & Yang, 1979) 52
Tableau 11. Analyse BlastN de groupe de séquences ACS d'hévéa. 62
Tableau 12. Détails des cinq clones *ACS* sélectionnés comme représentant la variabilité des populations des clones. Résultat issu de l'alignement de toutes les séquences clonées avec ClustalW. .. 63
Tableau 13. Comparaison du nombre et des longueurs des exons et des introns de *HbACS-D10* avec ceux d'autres espèces. 65
Tableau 14. Comparaison des séquences peptidiques codées par le gène *HbACS-D10* avec celles des autres espèces. 67
Tableau 15. Position des acides amines conservés susceptibles d'être essentiels pour l'activité catalytique des ACC synthases chez *L. esculentum*, *M. domestica*, et *H. brasiliensis.* 74
Tableau 16. Analyse BlastN des groupes de séquence *ACO* chez *H. brasiliensis* 80
Tableau 17. Résultat de l'alignement des séquences isolées à partir d'une analyse avec le logiciel ClustalW et sélection de celles représentatives de la variabilité des populations des clones 81
Tableau 18. Bilan du criblage des banques phagiques d'ADNc de méristème et d'écorce chez *Hevea brasiliensis.* 83
Tableau 19. Degré d'identité entre les ACOs connues chez *Hevea brasiliensis* et celles de quelques autres espèces. 94
Tableau 20. Comparaison des niveaux d'expression des gènes *ACO* obtenus par Northern, RT-PCR, HIS après 8h de stimulation éthylénique (Ethrel™ 2,5%). (NR) Non Réalisé, (ND) Non Détectable, (-) pas d'expression, (+)(++)(+++)(++++) intensité du signal. 107

ABREVIATIONS

ADN : Acide Désoxyribonucléique
ADNc : Acide Désoxyribonucléique complémentaire
ARN : Acide Ribonucléique
ATP : Adenosine Triphosphate
Acetyl-CoA : Acetyl-coenzyme A
Acetoacetyl-CoA : Acetoacetyl-Coenzyme A
ACS : ACC synthase
ACO : ACC oxidase
ACC : Aminocyclopropane Carboxylic Acid
ANS : Anthocyanine Synthase
ASA : Acetyl Salicylic Acid
AVG : Amino Ethoxyvinyl Glycine
AOA : Amino Oxyacetic Acid
AIB : Amino Isobutiric Acid
CTR : Constitutive Triple Response
CDPK : Calmodulin –like Domain Protein Kinase
CEPA : 2-Chloroethane Phosphonic Acid
CN : Caoutchouc Naturel
CS : Caoutchouc Synthétique
CLPD : Corynespora Leaf Fall Disease
DAOCS : Deacetoxycephalosporin C Synthase
DHAP : Dihydroxyacetone Phosphate
DIG : Digoxigénine
DRC : Dry Rubber Content
ETO : Ethylene Overproducer
ETR : Ethylene Triple Response
ERS : Ethylene Response Sensor
ERE : Ethylene Response Element
EREBP : Ethylene Response Element Binding Protein
EIN : Ethylene Insensitive
ERF : Ethylene Response Factor
EIL : EIN3-Like
F6P : Fructose-6-Phosphate
FDP : Fructose-1, 6-Piphosphate
GAP : Glyceraldehyde-3-Phosphate
G6P : Glucose-6-Phosphate
HMG-CoA : 3-Hydroxy-p-Methylglutaryl-Coenzyme A
HLE : Hypodermic Latex Extraction
IRRI : Indonesian Rubber Research Institute
IPNS : Isopenicilline N Synthase
IPP : Isopetenyl Pyrophosphate
JA : Jasmonic Acid
MVA : Mevalonic Acid
MVAP : Mevalonic Acid 5-Phosphate
MVAPP : Mevalonic Acid-5-Pyrophosphate
MACC : Malonyl Aminocyclopropane Carboxylic Acid
MTA : Méthyl Thioadénine
MAP : Mitogen activated protein
MAPK : Mitogen activated protein kinase

MAPKK	: Mitogen activated protein kinase kinase
MAPKKK	: Mitogen activated protein kinase kinase kinase
1-MCP	: 1-Aminocyclopropene
NES	: Nucleus Estate Scheme
NRB	: 2,5-Norbornadiene
OGA	: Oligogalacturonide
2OG	: 2-Oxoglutarate
ORF	: Open Reading Frame
PB 260	: Prang Besar 260
PEP	: Phospho-enol Pyruvate
1,3-PGA	: 1- 3-Phosphoglyceric Acid
3-PGA	: 3-Phosphoglyceric Acid
2-PGA	: 2-Phosphoglyceric Acid
PLP	: Pyridoxal 5'-Phosphate
PTGS	: Post-transcription Gene Silencing
RRI	: Rubber Research Institute
RT-PCR	: Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
ROS	: Reactive Oxygen Species
SRDP	: Smallholder Rubber Development Project
SAM	: S-Adenosyl-L-Methionine
SA	: Salicylic Acid
SIMKK	: Stress Induced MAP Kinase Kinase
TCSDP	: Tree Crop Smallholder Development Project
TPD	: Tapping Panel Dryness
UTR	: Untranslated Region

RESUME

L'éthylène joue un rôle majeur dans la stimulation de la production du caoutchouc naturel chez *Hevea brasiliensis*. La biosynthèse de l'éthylène est catalysée par l'ACC synthase et l'ACC oxydase chez les plantes. Ces enzymes sont codées par des familles multigéniques chez beaucoup d'espèces végétales. Leurs expressions sont régulées par des signaux développementaux, en réponse à des facteurs environnementaux, des régulateurs de croissance, l'attaque d'agents pathogènes ou la blessure. L'application d'éthéphon, un générateur d'éthylène, sur le panneau de saignée de l'hévéa est pratiquée depuis longtemps pour prolonger l'écoulement et activer la régénération du latex entre deux saignées. Dans certains cas, cette activation, si trop intensive, peut conduire à l'arrêt de l'écoulement par coagulation intra-laticifère des particules de caoutchouc : c'est l'encoche sèche. Ainsi, le rôle de l'éthylène exogène et de la blessure sur la production d'éthylène endogène a été étudié afin de mieux comprendre la régulation de tels phénomènes.

Trois gènes codant une ACC oxydase (*HbACO1; HbACO2 ; HbACO3*) et une codant une ACC synthase (*HbACS1*) ont été identifiés et caractérisés chez *Hevea brasiliensis*. Les séquences d'ADNc *HbACOs* ont respectivement une taille de 1115, 1183 et 1348 pb, avec une phase ouverte de-lecture (ORF) codant pour des polypeptides de 312, 318 et 318 acides aminés. Les structures des deux séquences génomiques *HbACO1* et *HbACO2* caractérisées sont différentes. En effet, *HbACO1* comportent 3 introns et 4 exons alors que *HbACO2* possèdent 2 introns et 3 exons. La région génomique du troisième membre *HbACO3* n'est pas entièrement isolée. En ce qui concerne *HbACS1*, le clone ADNc pleine longueur est de 1932 pb avec une ORF codant un polypeptide de 480 acides aminés ; le gène correspondant est d'une taille de 2928 pb avec une structure à 3 introns et 4 exons.

Tous les gènes *HbACO* sont exprimés à tous les stades de développement étudiés, du jeune plant à l'arbre exploité, et même dans les cals cultivés *in vitro* mais avec des profils très différents. Le gène *HbACO1* est exprimé à un niveau de base plus élevé que les autres gènes. Son expression décroît après traitement à l'éthylène ou à la blessure à la fois dans les feuilles et les écorces. Les gènes *HbACO2* et *HbACO3* sont au contraire sur-exprimés transitoirement en réponse au même traitement. Pour *HbACS1*, l'expression est induite à la fois par l'éthylène et la blessure. Un pré-traitement au 1-méthylcyclopropène (1-MCP), un inhibiteur de l'action de l'éthylène, abolit la sur-expression des gènes *HbACS1* et *HbACO2* induite par l'éthylène. Cela tend à démontrer que ces gènes sont sous une régulation positive de l'éthylène.

En conclusion, les résultats obtenus permettent de proposer que le gène *HbACO1* est impliqué dans la production d'un niveau de base d'éthylène et régulé négativement par des signaux environnementaux, tandis que les gènes *HbACS1, HbACO2* et *HbACO3* ne sont exprimés qu'en réponse aux facteurs externes. Un modèle de travail présentant le rôle potentiel de ces gènes sur la régulation de la biosynthèse d'éthylène et la régénération du latex est présenté.

MOTS-CLES

Hevea brasiliensis, ACC synthase, ACC oxydase, 1-MCP, éthylène, blessure, écorce, laticifère, feuille

INTITULE ET ADRESSE DE L'U.F.R. OU DU LABORATOIRE :

Equipe *Biotechnologies et génomique des plantes pérennes tropicales* – UMR 1098, Biologie du développement des espèces pérennes cultivées CIRAD - TA 80/03 - Avenue d'Agropolis - 34098 Montpellier

TITLE

Isolating and characterisation of genes encoding ACC synthase and ACC oxidase involved in ethylene biosynthesis in *Hevea brasiliensis*

ABSTRACT

Ethylene is a major stimulating factor of natural rubber production in *Hevea brasiliensis*. Ethylene biosynthesis in higher plants is catalyzed by ACC synthase and ACC oxidase. These enzymes are encoded by small multi family genes in many species and their expression is tightly controlled by developmental cues and in response to external environmental factors, growth substance treatments, pathogen attack and wounding. The application of ethephon, an ethylene releaser, onto the tapping panel of rubber tree is practised to enhance latex flow and its regeneration between two tappings. In some cases, this activation can stop the latex flow by favouring rubber particle coagulation: this is a phenomenon known as tapping panel dryness. In order to improve our understanding of this problem, the effect of exogenous ethylene and wounding on endogenous ethylene biosynthesis was investigated.

In this study, 3 full length of cDNA encoding ACC oxidases in *Hevea brasilensis, (HbACO1-HbACO2, HbACO3)*, and one full length of cDNA encoding an ACC synthase, *HbACS1* were isolated. The *HbACOs* are respectively 1115, 1183 and 1348 bp, with open reading frames (ORF) encoding polypeptides of 312, 318 and 318 amino acids respectively. The genomic structure of *HbACO1* was different from *HbACO2*. *HbACO1* consists of 1456 bp has three introns and four exons, while *HbACO2* (1418 bp) has two introns and three exons. The genomic structure of *HbACO3* has yet to be characterised. The 1932 bp *HbACS1* cDNA contains an ORF encoding a polypeptide of 480 amino acids. *HbACS1* consists of three introns and four exons.

All of the *HbACO* genes were expressed at all stages of development in the plant, from the callus to the exploited plant, but with different expression profiles. It appears that *HbACO1* is expressed at higher level than the other genes, and decreases its expression following ethylene treatment and upon wounding in both the leaf and bark. *HbACO2* and *HbACO3* were transiently induced in response to ethylene treatment and wounding. Treatment with 1-MCP, an ethylene action inhibitor, abolished the ethylene induction of *HbACO2* expression, showing that this gene was under positive feedback regulation. The expression of *HbACS1* was also induced by ethylene treatment and wounding, again with an antagonist effect of 1-MCP.

In conclusion, *HbACO1* is apparently expressed for basal levels of ethylene biosynthesis and might be regulated by developmental cues, while *HbACO2* and *HbACO3* appear to be expressed in response to external factors. *HbACS1* is also induced by external factors. A working model for the possible roles of these genes in relation to endogenous ethylene biosynthesis and latex synthesis is presented.

KEYWORDS

Hevea brasiliensis, ACC synthase, ACC oxidase, 1-MCP, ethylene, wounding

1 INTRODUCTION

1.1. HEVEACULTURE & *HEVEA BRASILIENSIS*

Environ 2000 espèces issues de plusieurs familles (*Moraceae, Euphorbiaceae, Asclepiadaceae, Compositae*) produisent du caoutchouc naturel (Butt & Beevers, 1966). Ces espèces sont réparties dans différentes régions tropicales et subtropicales. Parmi les plus importantes, on trouve : *Hevea brasiliensis* Muell.Arg., *Parthenium argentatum* Gray, *Ficus elastica* Cerv, *Funtumia elastica* Stapf, *Wilughbeia* spp., *Landolphia* spp. *Pallaquium gutta* Burck, *Payena* spp., *Mumusops balata* (Aubl)Gaertn, *Achras zapota* L., *Manihot galziovii* Muell.Arg. *Cryptostegia* spp., dan *Solidagi* spp. (Dijkman, 1951).

Parmi les élastomères, le caoutchouc naturel (CN) est le produit le plus répandu. Il est produit essentiellement par *Hevea brasiliensis*. Ce caoutchouc fait partie de notre vie quotidienne. Son utilisation est étroitement liée à la mobilité de l'homme et des biens de consommation à travers le transport : pneumatiques (73%), produits en caoutchouc (courroie de transmission, chaussures, sandales, etc. représentant 13%) et autres produits en latex (12%).

L'augmentation de sa demande est fonction du développement du niveau de vie. Ainsi, la forte croissance de la Chine tire la demande en CN. De plus, l'augmentation du prix du pétrole et de ses dérivés tels que le caoutchouc synthétique (CS) rend d'autant plus compétitif le CN. Tous ces facteurs ont favorisé une remontée du prix du CN depuis 2003 liée au risque de rupture entre la production et la demande.

La consommation en caoutchouc (naturel et synthétique) augmente en moyenne de 5.9 % par an depuis 1900 et a atteint en 2004 les 20,16 millions de tonnes quand elle était de 0,5 million de tonnes au départ. Cette augmentation était plus précisément de 5.6 % en 2004 et de 4.2% en 2005. La demande totale en caoutchouc serait de 31,3 millions de tonnes en 2035 dont 15 millions de tonnes pour le CN (Figure 1). Etant donné que la production actuelle est de 8,7 millions de tonnes, l'augmentation de la production est une question qui inquiète les économistes étant donné la faible disponibilité en terre arable pour étendre l'hévéaculture (Budiman, 2005).

L'hévéaculture joue un rôle économique et social important. Elle implique 50 millions de personnes. Après une crise en 1998, les cours du CN sont remontés pour atteindre un prix de vente attractif pour le producteur autour de 2 US-dollars le kg depuis 2005.

L'hévéaculture répond aux critères de développement durable du fait de l'augmentation de la demande en CN, de sa rentabilité économique et de la réponse aux grands enjeux écologiques de la séquestration du carbone et du replacement des matières premières à base de pétrole dont la pénurie est annoncée. L'hévéa est une source renouvelable de bois et de caoutchouc. Ainsi, cette capacité de l'hévéa de produire de la biomasse tend à conduire les différents acteurs à faire entrer l'hévéaculture dans le programme des Mécanismes de Développement Propre (*Clean Development Mechanism*) décrits dans le protocole de Kyoto de l'ONU.

Ainsi, l'augmentation de la production de caoutchouc naturel est préconisée dans la plupart des pays producteurs à travers l'augmentation des rendements de production et l'extension des plantations dans des zones non traditionnelles de culture. La résistance aux maladies et la tolérance à la sécheresse, en particulier pour l'extension de l'hévéaculture dans des régions à saison sèche marquée (nord-est de la Thaïlande, nord-est de l'Inde), représentent des préoccupations fortes de recherche pour proposer du matériel végétal plus performant dans le proche avenir.

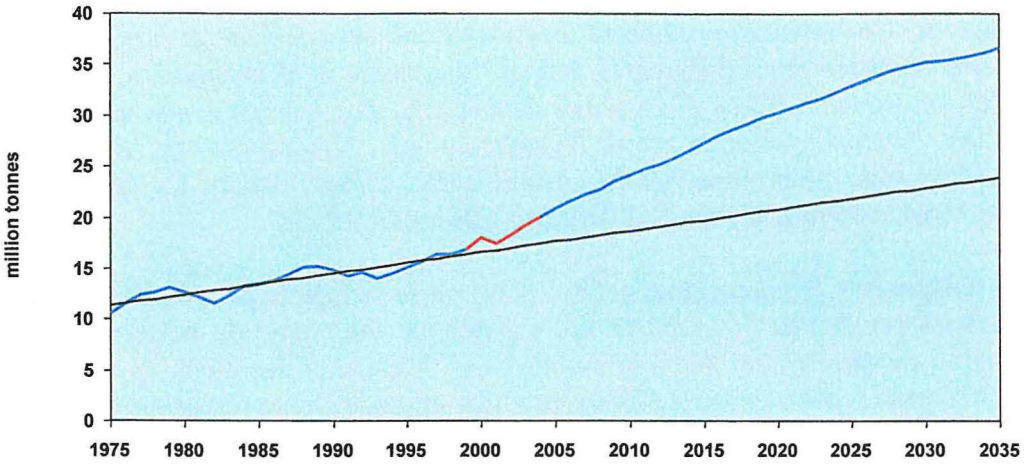

Figure 1. Tendances de la consommation (ligne bleu) et la production (ligne noire) mondiale en caoutchouc jusqu'en 2035 (Budiman, 2005).

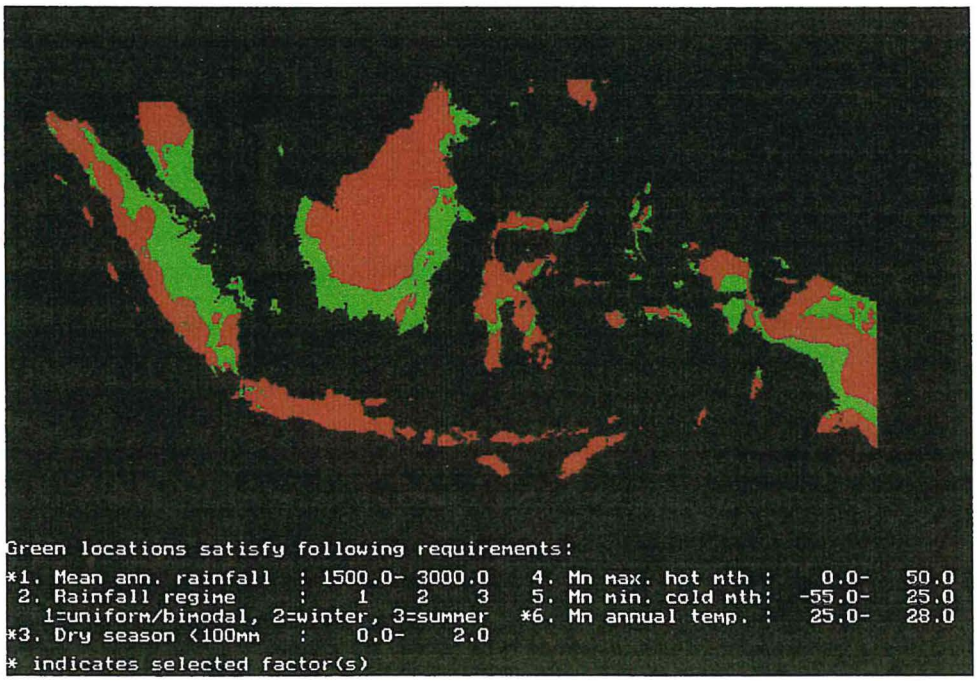

Figure 2. Régions avec un climat favorable pour l'hévéaculture en Indonésie et humide (en vert) et avec une saison sèche marquée (en rouge) (Wijaya, 2005).

1.2. PROBLEMATIQUE DE LA PRODUCTION DE LATEX

Hevea brasiliensis est une espèce tropicale originaire du bassin amazonien. L'hévéaculture s'est étendue jusqu'au 29° nord en Chine, Inde et Birmanie et 23° sud dans la région de Sao Paulo au Brésil. Les conditions favorables de culture sont de 20 à 28°C avec des pluies bien réparties tout au long de l'année (1800 à 2000 mm) à une altitude de 600 m, mais l'hévéa pousse jusqu'à des altitudes de 1000m en Ouganda ou en Colombie.

Des pluies excessives interfèrent avec la collecte du latex bien que l'utilisation de protection contre la pluie diminue ce problème. La croissance de l'hévéa est affectée par la sécheresse nécessitant dans certain cas l'irrigation, les faibles températures, ou encore la salinité des sols. L'hévéa est généralement considéré comme peu sensible aux facteurs pédologiques bien que la fertilisation en période immature puisse augmenter les rendements de production et la résistance aux maladies.

L'amélioration génétique de l'hévéa a démarré en 1910 par sélection massale des plants issus de graines les plus vigoureux. Dès 1916, le greffage est utilisé en horticulture mais ce n'est que dans les années 40 qu'il est appliqué largement pour diffuser les clones sélectionnés. Cela a permis de passer d'une production moyenne de 500 à 2000 kg CN/ha/an.

La floraison commence après la saison sèche. *H. brasiliensis* est monoïque. Les inflorescences mâles et femelles sont séparées mais portées par le même arbre. La fécondation croisée rend *H. brasiliensis* allogame. Les programmes d'amélioration utilisent donc la fécondation manuelle pour le contrôle des nouvelles recombinaisons génétiques. Une période de 25 ans est nécessaire pour recommander un nouveau clone.

Les clones propagés par greffage sont généralement préparés en sac polyéthylène puis plantés à une densité pouvant varier de 416 à 555 arbres/ha. Cette densité va varier en fonction des cultures intercalaires ou de la topologie du sol.

L'élevage des plants nécessite une fertilisation, le désherbage et des traitements phytosanitaires. En Indonésie, *H. brasiliensis* est sujet à plusieurs maladies :
- foliaires causées par *Colletotricum sp. Oidium sp* et *Corynospora sp* leaf fall disease (CLFD);
- d'écorces telles que le *black strip* et *mouldy rot* ;
- racinaires telles que le white rot (*Rigidoporus lignosus*) et brown rot.

La collecte du latex se fait par saignée de l'écorce à l'aide d'un couteau de saignée communément nommé *Jebong*. Cette saignée correspond à une entaille de 1,2 à 1,5 mm d'épaisseur de l'écorce en demi-spirale, du haut vers le bas et de gauche à droite. La blessure lors de la saignée doit éviter de toucher le cambium pour s'assurer d'une bonne régénération de l'écorce par ce tissu. Une bonne gestion de l'écorce peut permettre de récolter du latex pendant 20 à 25 ans.

Depuis une quinzaine d'années, le bois d'hévéa récolté en fin d'exploitation représente un sous-produit très bien valorisé. Ce bois est utilisé pour la fabrication de meubles et de parquets mais aussi comme aggloméré ou pâte à papier. Les programmes de sélection des nouveaux clones d'hévéa (*latex timber clones*) prennent donc en compte cette nouvelle composante.

1.3. PROBLEMATIQUE INDONESIENNE

L'Indonésie est le second producteur mondial de caoutchouc naturel après la Thaïlande avec 1,55 millions de tonnes de produit en 2004 sur 3,34 millions d'hectare. L'Indonésie produit environ 22 à 25% du CN mondial et en exporte plus de 90 % sous forme de fond de tasse (*crump rubber*). Seule une petite quantité est consommée sur place pour la fabrication de produits manufacturés tel que les gants en latex. Les données économiques de l'hévéaculture indonésienne entre 2002 et 2005 sont présentées dans le Tableau 1.

Tableau 1. Données économiques de l'hévéaculture en Indonésie

Données	Années					
	2000	2001	2002	2003	2004	2005
Surfaces (x1000 ha d'hévéa)	3372	3345	3318	3290	3262	3279
Production (x1000 tonnes CN)	1501	1607	1630	1792	2066	2271
Exportation (x1000 tonnes CN)	1379,6	1452,7	1497,3	1660,9	1874,3	2023,8
Valeur (millions $ USD)	888,6	782,1	1038,9	1493,5	2180	2582,5
Prix (USD/kg CN)	0,64	0,54	0,69	0,9	1,16	1,28
Part de la production mondiale (%)	22,2	22,29	22,83	23,27	23,97	25,25
Consommation (x1000 tonnes)	139	142	145	156	196	221

La production est assurée par 84,9% de petites exploitations et 15,1% de plantations industrielles soit gouvernementales soit privées. La production a atteint 2,2 millions de tonnes en 2005. La productivité des petites plantations est d'environ 600 à 900 kg/ha/an alors qu'elle passe à 1100 à 1800 kg/ha /an dans les grandes plantations. La faible productivité des petites exploitations est due à l'utilisation de plants issus de graines non sélectionnées.

Le gouvernement indonésien souhaite que le pays devienne le premier producteur d'ici quelques années. Cette priorité nationale passe par le remplacement chez les petits planteurs des plantations non clonales (plants issus de graines), en monoculture ou en *jungle rubber,* peu productives, qui représente 83% des surfaces totales plantées, par des plantations clonales plus performantes (1100-1200 kg/ha/an, rendements obtenus dans les PTP plantations d'état (8% des surfaces) et les plantations privées (9% des surfaces) (comm. pers., directeur de l'IRRI). Le renouvellement des vieilles plantations avec des clones hauts producteurs propagés par greffage est donc urgent mais ralenti par des problèmes économiques des planteurs face aux investissements nécessaires. Entre 1980 et 1990, le gouvernement a créé plusieurs projets de replantation pour stimuler le développement des plantations clonales chez les petits planteurs en apportant des aides financières : NES (*Nucleus Estate Scheme*), SRDP (*Smallholder Rubber development project*) and TCSDP (*Tree Crop smallholder development project*). Toutefois, ces sources de financement ne permettent d'atteindre que 15% du total des plantations d'hévéa en Indonésie.

La seconde composante fait appel à l'augmentation des surfaces plantées principalement dans des zones comportant une saison sèche peu favorable à la production de latex (faible disponibilité en eau pour l'écoulement du latex) par exemple dans l'île de Java où 4 mois de

sécheresse sévissent (comm. pers., Thomas, centre de Sembawa, IRRI) ou encore l'ouest de Sumatra ou le centre et le nord de Kalimantan (Figure 2) (Wijaya, 2005).

En Indonésie, l'hévéa est cultivé à Sumatra et Kalimantan avec des pluies fluctuant de 1500 à 4000 mm par an et avec des saisons sèches allant de 0 à 4 mois par an. A maturité, l'hévéa peut atteindre 20 à 30 mètres de haut. Les arbres sont saignés pour la collecte de latex lorsque 60% de la population a atteint 45 cm de circonférence de tronc à 1 mètre de hauteur. Cette maturité survient généralement entre 5 et 7 ans. Les arbres non matures sont saignés systématiquement l'année suivante. Cette maturité correspondrait à une maturité dite « physiologique » de l'hévéa pour la production de latex (Obouayeba, 2002).

L'encoche sèche ou *Tapping Panel Dryness* (TPD) est un facteur important affectant la production de caoutchouc en Indonésie. Ce syndrome touche environ 10% des arbres dans les plantations clonales des PTP et près de 20% des arbres dans les *jungles rubber* (comm. pers. Dr Siswanto, IBRIEC).

1.4. EXPLOITATION DE L'HEVEA & PRODUCTION DE LATEX

1.4.1. Récolte du latex

La saignée consiste à pratiquer une entaille de l'écorce tendre afin de sectionner le tissu laticifère à l'aide d'un couteau ou d'une gouge. Cette encoche est généralement en demi-spirale et toujours inclinée de gauche à droite de manière à suivre l'orientation des manteaux laticifères. L'organisation des cellules laticigènes en manteaux concentriques se prête particulièrement bien à cette opération (Jacob *et al.*, 1995). Les manteaux laticifères sont séparés par des cellules parenchymateuses et des tubes criblés transportant la sève élaborée. Des rayons médullaires disposés horizontalement relient le liber et les vaisseaux du bois : ils permettent ainsi les échanges d'eau, d'éléments minéraux et de glucides entre les différents tissus (Figure 3) (Gomez, 1983). Sous l'effet de la forte pression de turgescence (10-15 bars) qui règne au sein des laticifères de l'écorce, le latex est expulsé et s'écoule le long de l'encoche de saignée. La cause principale de l'arrêt de l'écoulement semble être l'obstruction de l'extrémité sectionnée des laticifères (Boatman, 1966).

1.4.2. Voies métaboliques essentielles impliquées dans la production de latex

La production de latex dépend de la durée d'écoulement du latex et de sa régénération *in situ* entre deux saignées. Le latex est un cytoplasme (Andrews & Dickenson, 1961; Cockbain & Southorn, 1962; Gomez & Moir, 1979; Hébant, 1981), dont la composition et l'organisation reflètent la fonction biologique du tissu laticifère.

Le β-cis-polyisoprène est la molécule de base du caoutchouc naturel. Il est synthétisé dans les cellules laticifères à partir du saccharose transporté activement par un symport H+/saccharose nécessitant une activité ATPase pompe à proton (Tupy, 1984, Lacrotte, 1991). La biosynthèse du caoutchouc naturel a été schématisée par Moir (1969) (Figure 4). Ce saccharose est métabolisé via la glycolyse et la voie des mévalonates en isopentényl

pyrophosphate (IPP). L'IPP est le maillon de la chaîne de β-cis-polyisoprène qui se polymérise dans les particules de caoutchouc, c'est l'anabolisme isoprénique.

L'écoulement du latex est intimement lié à la capacité de détoxiquer les formes toxiques d'oxygène. Ces formes sont principalement produites par des enzymes de type oxydase et hydrolase. Les contraintes physiques lors de l'écoulement du latex après la saignée provoquent une dégradation des lutoïdes et des particules de Frey-Wyssling. La libération des oxydases en présence de substrat $O_2^{\cdot}$ déclenche le processus de coagulation. Les particules de Frey-Wyssling contiennent des o-diphénol-oxydases et produisent des quinones (Hanover *et al.*, 1976). Au niveau des lutoïdes, c'est l'activation de la NADH–quinone réductase génératrice d'anions superoxydes qui provoque la peroxydation des lipides polyinsaturés du tonoplaste lutoïdique aboutissant à la lyse membranaire (Chrestin *et al.*, 1984). Le pH cellulaire, la concentration en cations et certaines protéines (glucanases) vont modifier la viscosité du latex en favorisant le rapprochement des particules de caoutchouc en neutralisant les charges négatives à leur surface. La libération des agents coagulants (hévéine) et anti-coagulants (chitinase, N-acétyl-β-D-glucosaminidase) contenus dans les lutoïdes va alors permettre le processus de coagulation. D'après le modèle développé par Gidrol (Gidrol *et al.*, 1994), l'hévéine est liée aux particules de caoutchouc en se fixant sur des récepteurs à leur surface membranaire. Les activités chitinases au contraire inhiberaient ce processus en provoquant une déglycosylation des récepteurs de 20kDa de l'hévéine. Les activités de détoxication enzymatiques de ces formes toxiques d'oxygène et les composés antioxydants joueraient inversement un rôle prépondérant dans la stabilité du latex.

1.4.3. Effets de la stimulation par l'éthéphon

La découverte de l'éthéphon (acide 2-chloroéthylphosphonique) régulateur de croissance et générateur d'éthylène a permis d'augmenter le niveau de production en induisant un écoulement prolongé et en activant le métabolisme. Il a été dès lors possible de réduire les fréquences de saignée tout en maintenant la production en caoutchouc naturel à l'aide des systèmes d'exploitation utilisant la stimulation éthylénique (Eschbach & Banchi, 1985). Toutefois, l'emploi raisonné de l'éthéphon avec des fréquences de stimulation et des concentrations de matière active adaptées est requis afin de ne pas initier des dysfonctionnements cellulaires pouvant engendrer l'apparition d'encoche sèche de saignée impliquant une perte de production (Chrestin *et al.*, 1985; Lacrotte *et al.*, 1997; Sookmark *et al.*, 2002).

Plusieurs études ont mis en évidence l'influence de l'éthylène exogène sur la biosynthèse d'éthylène endogène et ont permis de caractériser les réponses physiologiques en fonction des clones d'hévéas. La régulation par l'éthylène de l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la régénération et l'écoulement de latex dont le métabolisme oxydatif a été aussi intensément étudiée (Chrestin *et al.*, 1997; Pujade-Renaud *et al.*, 1994).

L'amélioration de l'écoulement est obtenue en favorisant l'entrée d'eau dans les cellules laticifères et le maintien de la stabilisation des lutoïdes (vacuoles contenant des protéines impliquées dans la coagulation des particules de caoutchouc). La stimulation du métabolisme laticifère est favorable à la régénération du latex après la saignée. Ainsi, de nombreux travaux tant sur le plan physiologique que biochimique ou moléculaire ont porté sur l'étude du métabolisme laticifère en relation avec la réponse à la stimulation éthylénique. Toutefois, nous ne disposons à ce jour que de peu d'informations sur la régulation de la biosynthèse

endogène d'éthylène et sa signalisation dans la production de caoutchouc naturel chez l'hévéa.

L'influence des traitements à l'éthéphon à la fois sur la biosynthèse d'éthylène, sur la production de latex et sur la dégénérescence des tissus suggère une implication importante de l'éthylène endogène dans les mécanismes moléculaires opérant dans les tissus laticifères mais aussi au sein des différents tissus de l'écorce. L'évolution des paramètres métaboliques liés à la production et le dysfonctionnement cellulaire sont généralement mesurés sur plusieurs années d'exploitation des arbres. L'étude des effets de l'éthylène, de la blessure et de l'activation métabolique lors de l'entrée en saignée permet de caractériser les clones appelés « *slowstarter* » ou « *quickstarter* » (Serres *et al.*, 1994), (Jacob *et al.*, 1988). Ces derniers sont généralement sujets à l'encoche sèche lors d'une exploitation trop intense. La vitesse d'activation métabolique est corrélée à la teneur en phosphate inorganique qui reflète l'utilisation de l'ATP (Chrestin & Bangratz, 1988). Cette vitesse est un paramètre clonal qui conditionne la montée en production des arbres dès les premières saignées. Une compréhension plus fine de ces processus devrait conduire à l'établissement d'un modèle de fonctionnement sous l'influence de l'éthylène permettant d'élaborer des stratégies d'études sur des arbres en exploitation permettant d'appréhender le rôle de l'éthylène dans la production de latex et la dégénérescence des tissus.

1.4.4. Stimulation pour des systèmes à faible fréquence de saignée

Quand la stimulation a été introduite, l'objectif était d'augmenter la production de latex et de favoriser la régénération de l'écorce. Depuis une vingtaine d'années, l'industrie du caoutchouc naturel est menacée par un manque de main d'œuvre (« saigneurs ») et une faible productivité de l'hévéaculture (coût de production élevé par rapport au bénéfice du CN). L'augmentation de la productivité de l'hévéaculture est donc passée par une diminution des coûts de la main œuvre en favorisant de plus faibles fréquences de saignée, tous les 3 ou 4 jours (d/3 or d/4) et même tous les 6 jours (Eschbach & Banchi, 1985), la réduction de la longueur de l'encoche (mini-encoche de saignée au lieu de la demi-spirale) en appliquant la stimulation à l'éthéphon pour maintenir le même niveau de production de latex (Hashim, 1982; Lukman, 1995; Sivakumaran & Hashim, 1985). Ce système à faible intensité nécessite la stimulation en démarrant avec un faible dosage (1 à 2,5% d'éthéphon) sur les arbres vierges (ouverture ou première saignée) (Junaidi & Kuswanhadi, 1995; Thanh *et al.*, 1996). La fréquence d'application du stimulant dépend du clone cultivé et du système de saignée (panneau de saignée, saignée remontante ou descendante (Gohet, 1996). L'avantage de ce système à faible fréquence de saignée est donc très avantageux en termes économiques (coût de la main œuvre, durée de vie de la plantation par économie du panneau de saignée vierge).

1.4.5. Du concept d'écoulement prolongé vers la sur-stimulation en fin d'exploitation

La mécanisation de la saignée ne paraît pas un mode d'exploitation possible à développer pour diminuer le coût de la main d'œuvre. Cependant, de nombreux essais ont visé la prolongation de l'écoulement du latex à l'aide de la stimulation à l'éthylène gaz afin de réduire les fréquences de saignée. Devant les difficultés rencontrées (déformation de l'écorce, formation de liège, encoche sèche sur le long terme), les travaux ont abouti à une préconisation en fin de vie des plantations pour extraire le maximum de latex avant abattage des arbres. Il est donc fréquent maintenant de voir augmenter les fréquences de saignée et/ou

de stimulation à l'éthéphon les 2-3 dernières années d'exploitation (Sethuraj & George, 1976).

Parmi les méthodes utilisant l'éthylène gaz, les systèmes HLE (*hypodermic latex extraction*) (Guha *et al.*, 1992), et RRIMFLOW (Sivakumaran *et al.*, 1991; Sivakumaran *et al.*, 1995), utilisent respectivement des saignées par piqûre ou par mini-encoches. Ces deux systèmes comportent la fixation par collage sur de l'écorce gratté d'un applicateur en plastique disposant d'une valve à air. L'applicateur est relié à une poche remplie d'éthylène gaz une fois par semaine. Après stimulation, le latex est extrait par piqûres de 1 à 2,5 mm de diamètre ou par mini-encoches. Les évaluations du système RRIMFLOW à moyen terme montrent une augmentation de la production de latex allant de 19% à 139% suivant les clones. Cette méthode est applicable à la fois sur des panneaux de saignée vierges ou régénérés (Sivakumaran *et al.*, 1991).

Un autre système est développé dès 1991, le REACTORRIM, dont le principe est de diffuser en continu dans l'écorce du tronc de l'éthylène provenant d'un récipient où se produit la réaction de dégagement. Un diffuseur métallique est fixé à l'arbre. La saignée consiste en 3 piqûres sur une courte spirale. Dès 1995, le système est amélioré avec la mise en place d'un nouveau réservoir permettant l'injection directe d'éthylène sous pression. Une micro valve libère l'éthylène progressivement (RRIM, 1993).

L'utilisation de ces systèmes nécessite cependant d'exploiter des arbres vigoureux indemnes de maladies ou d'encoche sèche, avec une épaisseur adéquate de l'écorce, une qualité de saignée optimale sans blessure et enfin d'appliquer une fertilisation.

1.4.6. Mode d'action des stimulants

Quelque soit la nature chimique du stimulant, la réponse passe soit par une production d'éthylène endogène soit par un processus de décomposition hydrolytique (Abraham *et al.*, 1968a; Abraham *et al.*, 1971; Gomez, 1983). La stimulation retarde l'obturation des vaisseaux laticifères et prolonge de ce fait la durée de l'écoulement du latex (Boatman, 1966). Cela passe par un processus de stabilisation des lutoïdes, qui contiennent des agents de coagulation (Ribailler, 1972)], lié à la réduction de la perméabilité membranaire (Coupé *et al.*, 1977). La réduction de la libération des polyphénols oxydases en provenance des particules de Frey-Wyssling limite aussi l'obturation des vaisseaux.

La stimulation favorise par ailleurs la régénération du latex entre deux saignées. L'augmentation du pH du latex accompagne une augmentation de l'activité invertasique (Jacob *et al.*, 1983; Tupy, 1973; Tupy & Primot, 1976). Les teneurs en thiols, anions, phosphore diminuent dans le cytosol tandis que celle des cations divalents augmente.

Un graphique modélisant l'action de l'éthylène sur la production a été présenté dans la Figure 5 (Hashim, 1989).

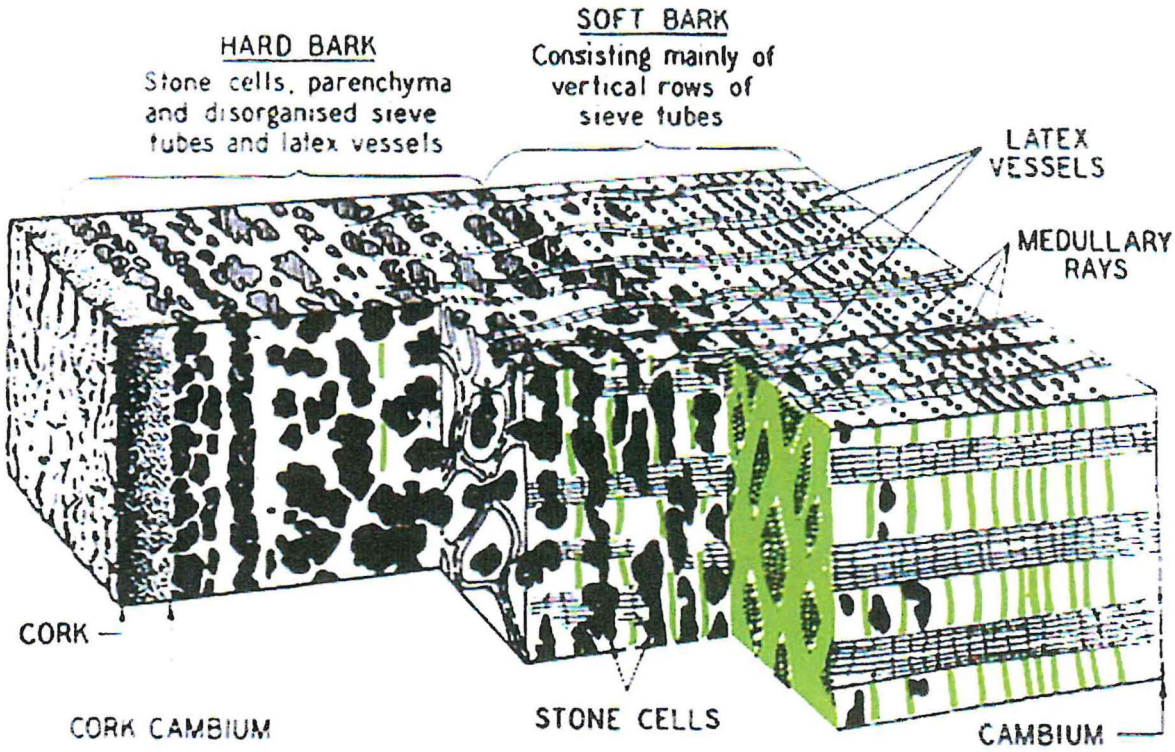

Figure 3. Anatomie de l'écorce de *Hevea brasiliensis* (Gomez, 1983)

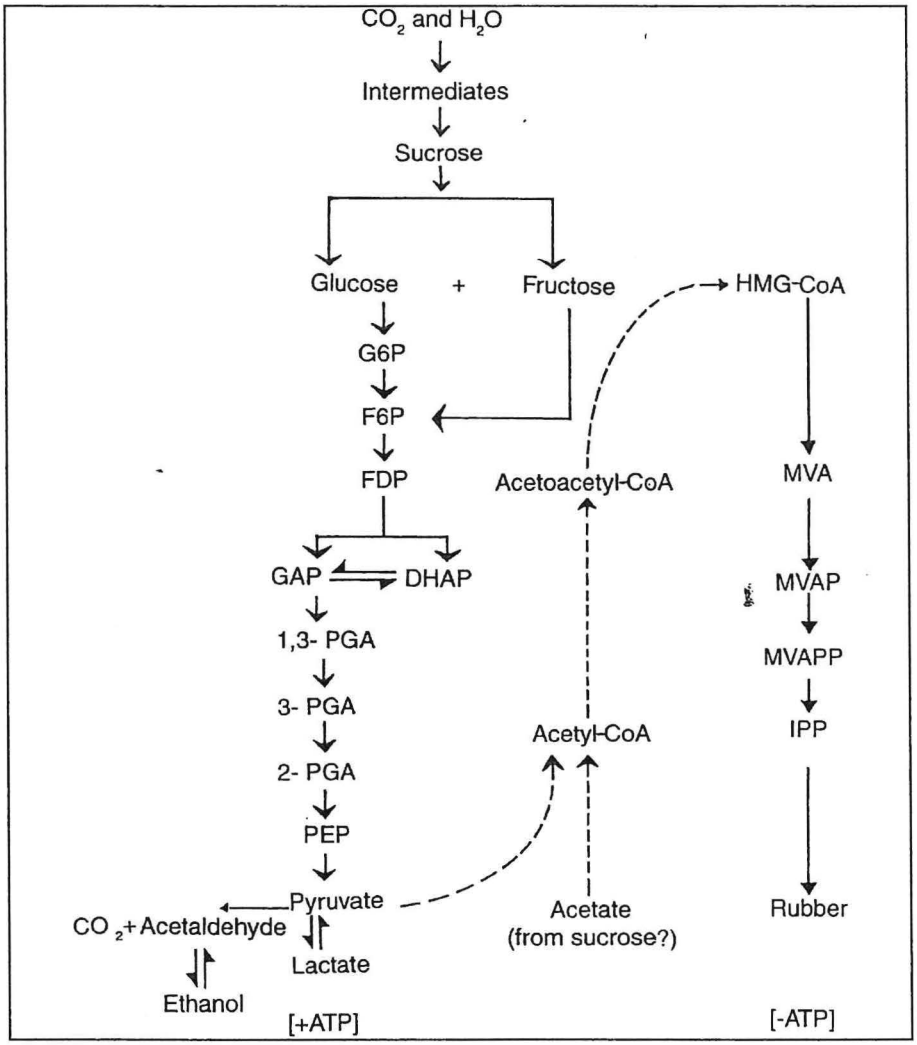

Figure 4. Etapes principales impliquées dans la biosynthèse du caoutchouc naturel chez *Hevea brasiliensis* (Moir, 1969).

1.5. ETHYLENE CHEZ LES VEGETAUX

Depuis la découverte par D.N. Neljubov (1879-1926) que l'éthylène est le composé biologique actif présent dans le gaz luminescent qui cause la croissance horizontale des plants de pois étiolés (Abeles *et al.*, 1992), les recherches sur cette substance se sont intensifiées. En 1930, il est montré que les plantes sont capables de produire de l'éthylène durant leur développement et leur croissance dans tous les organes (feuilles, tiges, fleurs, fruits et graines). L'éthylène, un alcène gazeux, présente la structure moléculaire la plus simple des phytohormones.

Son implication a également été démontrée dans de nombreuses phases du développement telles que la germination des graines, la sénescence et l'abscission des feuilles et des fleurs, la croissance et le développement des racines, le développement et le mûrissement des fruits. L'hormone éthylène est aussi synthétisée en réponse aux stress, à la blessure, à l'infection par des agents pathogènes, à l'exposition à des métaux lourds et en réponse à la sécheresse.

1.5.1. Biosynthèse de l'éthylène

La biosynthèse de l'éthylène a été élucidée par Adam et Yang en 1979 (Adam & Yang, 1979). Elle se fait en 3 étapes (Figure 6). A l'origine de la voie de biosynthèse, la production de S-adénosyl méthionine (SAM) est catalysée par la SAM synthétase ou la méthionine adénosyltransférase à partir de la méthionine et d'un ATP. Ensuite, l'ACC synthase convertit la SAM en acide aminocyclopropane-1-carboxylique (ACC) (Kende, 1993). Lors de l'étape finale, la conversion de l'ACC en éthylène est réalisée par l'ACC oxydase (Yang & Hoffman, 1984). La méthylthioadénine (MTA) est recyclée en méthionine *via* le cycle de Yang (Capitani *et al.*, 2005).

Il est maintenant bien connu que la biosynthèse de l'éthylène est sujette à une régulation en retour positive ou négative (Kende, 1993). La régulation en rétrocontrôle est une caractéristique de la maturation des fruits et de la sénescence. Il est aussi bien accepté que la teneur en ACC est normalement faible dans les tissus végétaux et que sa synthèse est une étape limitante de la production de l'éthylène.

1.5.1.1. ACC synthase

L'acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique (ACC) synthase est codée par une famille multigénique (Ge *et al.*, 2000; Kende, 1993; Wang *et al.*, 2002), dont l'expression est régulée de façon différentielle par différents signaux développementaux, environnementaux et hormonaux (Barry *et al.*, 2000; Ge *et al.*, 2000; Llop-Tous *et al.*, 2000). Cependant, les différents isomères de l'ACC synthase présentent des conservations variables en acides aminés identiques allant de 50 à 96% (Rottmann *et al.*, 1991). Parmi les acides aminés les plus conservés, l'arginine en position 286 est impliquée dans la liaison entre le cofacteur et la SAM. L'ACC synthase ou ACS appartient à la famille des enzymes pyridoxal phosphate, ses plus proches voisins étant les aminotransférases : cette enzyme contient un groupement pyridoxal phosphate dont 7 des 8 domaines sont conservés dans le groupe. L'ACS est une enzyme peu abondante et extrêmement labile par inactivation induite par son substrat. Les polypepdides d'ACS ont un poids moléculaire généralement compris entre 45 et 60 kDa.

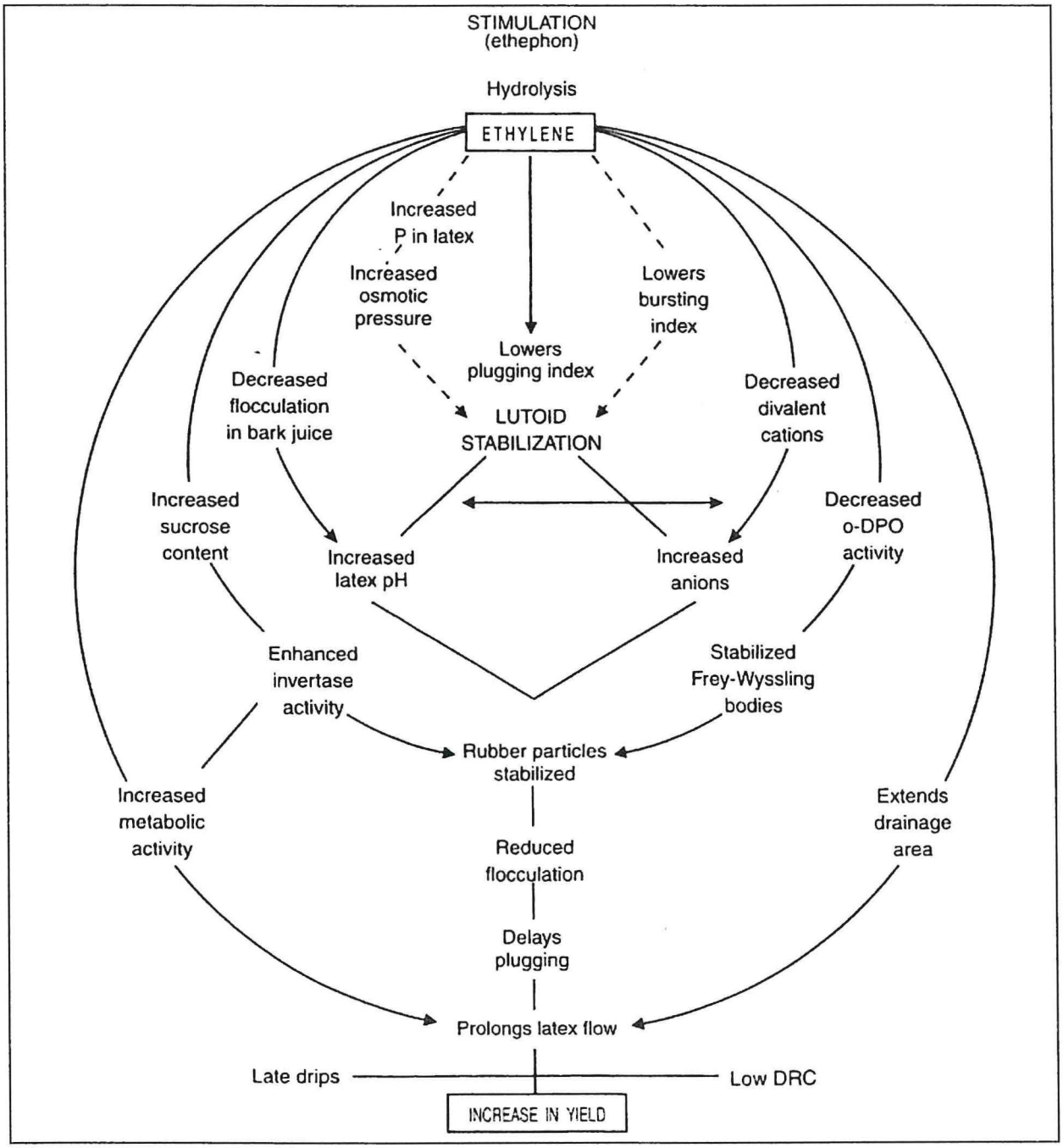

Figure 5. Schéma de l'action de l'éthylène sur la stimulation de la production de latex par Hashim (1989)

L'ACS est codé par une famille multigénique comportant :
- 9 membres chez la tomate (Oetiker *et al.*, 1997; Shiu *et al.*, 1998; Van der Straeten *et al.*, 1990; Zarembinski & Theologis, 1993),
- 6 chez le haricot mungo (*Phaseolus aureus*) (Botella *et al.*, 1992; Yoon *et al.*, 1997),
- et 5 chez la pomme de terre et le tabac (Destefano-Beltran *et al.*, 1995).

Les séquences complètes des génomes du riz et d'*Arabidopsis* permettent d'identifier respectivement 5 et 12 gènes *ACS* potentiels (Van Der Straeten *et al.*, 2001), (Salanoubat *et al.*, 2000). Pour *Arabidopsis*, la caractérisation des gènes *AtACS1* et *AtACS3* a montré que l'enzyme AtACS1 n'est pas fonctionnelle et que le second est un pseudo-gène (Yamagami *et al.*, 2003).

Les gènes *ACS* sont exprimés :
Soit, de façon spécifique dans les tissus de l'hypocotyle, des feuilles, des racines, des tubercules, des pétioles, des fleurs (pétales, pistil) ou des fruits,
Soit, ils sont induits en réponse aux stress biotiques et abiotiques tels que les radiations, le Cu^{2+}, le Li^{+}, l'ozone, la blessure, l'acide amino-oxyacétique, le cyclohéxamide, l'EIX, les inhibiteurs de protéine kinase, l'anaérobiose par immersion, l'éthylène, l'IAA, la benzyladénine, le froid et les agents pathogènes (Ge *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2002).
D'une part, l'expression de chaque membre est différentiellement régulée en fonction de facteurs développementaux et environnementaux (Arteca & Arteca, 1999; Clark *et al.*, 1997; Ge *et al.*, 2000; Oetiker *et al.*, 1997; Rottmann *et al.*, 1991; Shiu *et al.*, 1998; Van der Straeten *et al.*, 1990; Wang & Arteca, 1995; Zarembinski & Theologis, 1993). D'autre part, un seul signal peut coordonner l'expression de plusieurs gènes *ACS* en même temps (Olson *et al.*, 1991; Subramaniam *et al.*, 1996).

Comme membre de la famille des enzymes dépendants du pyridoxal 5'-phosphate (PLP), l'ACS catalyse la formation d'ACC grâce à la fonction « α,γ-elimination » (Adam & Yang, 1979). Basé sur la structure du cristal de l'ACS de pommier dont le site actif de l'enzyme a été identifié par marquage radioactif, un mécanisme catalytique de la production d'ACC à partir de la SAM a été proposé. Ce mécanisme implique plusieurs étapes (Capitani *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 1990a; Yip *et al.*, 1990).

Les isoenzymes ACS d'*Arabidopsis* sont biochimiquement distinctes. Il est proposé que ces isoenzymes fonctionnent dans des environnements cellulaires uniques pour la synthèse d'éthylène permettant à la molécule signal d'exercer des effets uniques sur un tissu ou des effets qui s'entrecroisent (Yamagami *et al.*, 2003). Cette capacité d'activité spécifique ou croisée révèle un code combinatoire de co-expression spatio-temporelle parmi les membres de différentes familles multigéniques durant le développement en réponse à des stimuli environnementaux (Tsuchisaka & Theologis, 2004).

La régulation de l'ACS se fait à plusieurs niveaux : transcriptionnel, post-transcriptionnel et post-traductionnel. Il existe des contrôles de l'épissage des ARNm, de la synthèse protéique, de la modification de la protéine ACS native incluant des processus en C- ou N-terminal et des modifications avec des liaisons covalentes telles que la phosphorylation ou l'alkylation.
La régulation transcriptionnelle est induite au cours du développement et en réponse aux stress.

La régulation post-transcriptionnelle a été mise en évidence par accumulation de transcrits non épissés en condition de stress (Olson *et al.*, 1995). Les modifications post-traductionnelles en C-terminal sont observées et conduisent à des formes hyperactives de

l'ACS. En effet, l'ACS a une courte demi-vie du fait d'un mécanisme d'inactivation préexistant. Une autre régulation se fait par élimination de son substrat, la SAM, par formation du L-vinylglycine qui cause l'alkylation et l'inactivation de l'enzyme (Satoh & Yang, 1989). Des études pharmacologiques suggèrent que la phosphorylation est aussi impliquée dans la régulation de l'activité de l'ACS (Liang *et al.*, 1996; Spanu *et al.*, 1994). Par exemple, la LeACS2 est phosphorylée dans la région C-terminale (Tatsuki & Mori, 2001). Cette régulation de la stabilité de la protéine par phosphorylation réversible se fait sur la Ser460. Des études basées sur la synthèse de peptides synthétiques ont montré que le site (KKNNL**RLS**^{460}**F**SKRMY) est reconnu et phosphorylé *in vitro* par plusieurs kinases dépendantes du calcium (CDPKs) mais pas par des protéines kinases reliées au SNF1 ou bien des sous-unités catalytiques de récepteurs kinases tel que BRI1 impliqué dans la signalisation des brassinostéroïdes (Sebastia *et al.*, 2004).

Des études récentes sur les mutants ETO (*ethylene over producer*) d'Arabidopsis (*eto1, eto2* et *eto3*) ont permis de décortiquer les mécanismes sous-jacents à la régulation post-traductionnelle de la biosynthèse de l'éthylène (Chae *et al.*, 2003; Vogel *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2004; Woeste *et al.*, 1999). ETO-1 est un régulateur négatif de la production d'éthylène en interagissant avec AtACS5 (Yoshida *et al.*, 2005). ETO-1 réduit l'activité de AtACS5 (ACS de type 2) en augmentant la dégradation par la voie dépendante du protéosome. En effet, ETO-1 interagit spécifiquement avec AtCUL3 (cullin) au sein d'un nouveau type de complexe E3 ubiquitine ligase. D'autres orthologues de ETO-1 ont été identifiés chez la tomate.

Ainsi, on peut classer les ACC synthases en 3 types selon la régulation par phosphorylation des régions C-terminales (Yoshida *et al.*, 2005) :

Type 1 : Isozyme à longue queue (23-27 acide aminés) après le RLSF (ex : LeACS2)
Type 2 : Isozyme qui possède la séquence WVF juste avant le RLSF, et qui ont une courte queue (5-8 acide aminés) riche en Arginine (R) et acides aminés acides (D, E) après le RSLF et à la fin (E, R) (ex : AtACS5 et LeACS3)
Type 3: Isozyme pour lequel il manquait le RSLF (ex: AtACS7 et LeACS4).

AtACS3, AtACS10 et AtACS12 ne sont pas inclus dans cette classification car *AtACS3* est un pseudogène tandis que AtACS10 et AtACS12 ne sont pas des ACS mais des aminotransférases.

Deux groupes de protéines kinases régulent les ACC synthase au niveau post-traductionnel par phosphorylation. Le premier est constitué des protéines kinase dépendantes du calcium (CDPK) et le second est formé des protéines kinases à activité mitogène (MAPK) (Chae & Kieber, 2005). Par exemple, le CDPK phosphorylé l'ACS5 et l'ACS9, alors qu'une MAPK (MAPK6) phosphoryle l'ACS2 et l'ACS6 lors de l'induction par la blessure ou un stress abiotique chez l'arabette.

La structure, l'activité catalytique et l'évolution des ACC synthase chez les végétaux supérieurs ont été largement décrites (Jakubowicz, 2002). On peut donc identifier plusieurs régions peptidiques très conservées parmi les ACS qui sont utiles pour la définition d'amorces dégénérées et l'isolement des gènes ACS chez d'autres espèces. Chez la tomate on peut retenir :

- (49)IQMGLAEQL(58)
- (89)FQNYHGLP(97)
- (136)FCLANPG(142)

- (205)TNPSNPLGT(213)
- (274)TSLSKNMGLPGFRVG(288)
- (304)MSSFGLVS(311)
- (408)PGWFRVCFAQ(417)

Ainsi, les résidus importants pour la catalyse et la structure de l'ACC synthase ont été rapportés comme il suit pour LeACS2 (**Tableau 2**) :

La substitution de Tyr^{92} par Phe^{92} ou Trp^{92} ne conduit qu'une activité partielle de l'enzyme alors son remplacement par His^{92} ou Leu^{92} inactive totalement l'enzyme. D'autres travaux montrent par contre que ce résidu n'est pas essentiel pour l'activité enzymatique mais qu'il joue un rôle dans la liaison du cofacteur PLP et dans le contact entre unités pour former le dimère d'ACS (Capitani *et al.*, 1999; Tarun *et al.*, 1998).
La substitution de Arg^{286} par la Leu^{286} donne un mutant ayant une plus faible affinité pour le PLP et la SAM. En revanche, ce remplacement par Val, Thr, Ile ou Ala induit une perte de 95 à 100 % de l'activité originale (Tarun *et al.*, 1998).

1.5.1.2. ACC oxydase

L'ACC oxydase, ou *Ethylene Forming Enzyme*, est l'enzyme qui catalyse la conversion de l'ACC en éthylène, dioxyde de carbone et cyanure. La détoxication du cyanure en cyanoalanine est réalisée *ex temporis* par la β-cyanoalanine synthase (Figure 6).

Le premier gène codant l'ACC oxydase (ACO) a été isolé chez la tomate en 1987 par Holdsworth (Holdsworth *et al.*, 1987). Ce gène est exprimé dans les fruits de tomate en réponse à l'éthylène exogène et la blessure. De nos jours, des gènes *ACO* ont été isolés chez de nombreuses espèces monocotylédones aussi bien que dicotylédones (Tableau 3).

L'ACC oxydase est codée par une petite famille multigénique dont les séquences sont fortement conservées dans la partie traduite du gène. Par contre, les séquences montrent une grande divergence dans leurs régions 3' non codantes (Barry *et al.*, 1996; Do *et al.*, 2005).

Cette famille multigénique est composée de :
- 5 membres chez la tomate dont 4 avec des séquences disponibles dans les bases de données (Barry *et al.*, 1996) et un dernier membre non déposé à ce jour (Sell & Hehl, 2005),
- 3 chez le tournesol (Liu *et al.*, 1997),
- 3 chez le melon (Lasserre *et al.*, 1997)
- 3 chez le tabac (Kim *et al.*, 1998; Knoester *et al.*, 1995).

L'expression des gènes *ACO* dans les plantes supérieures est régulée au cours du développement et en réponse à l'environnement. Chaque membre de la famille multigénique peut être induit spécifiquement dans un organe ou un tissu (hypocotyle, feuille, racine, pétiole, fleur, pétale, pistil, étamine, ou le fruit) ou en réponse à un stimulus biotique ou abiotique (blessure, faible concentration en O_2, forte teneur en CO_2, inondation, substance de croissance, froid, pathogènes) (Abeles *et al.*, 1992). La réponse aux signaux environnementaux (Barry *et al.*, 1996; Lasserre *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1997), et la coordination de l'expression de plusieurs *ACO* par un seul facteur développemental ou environnemental (Barry *et al.*, 1996; Huang *et al.*, 1991; Sato & Theologis, 1989) sont maintenant bien illustrées dans la bibliographie.

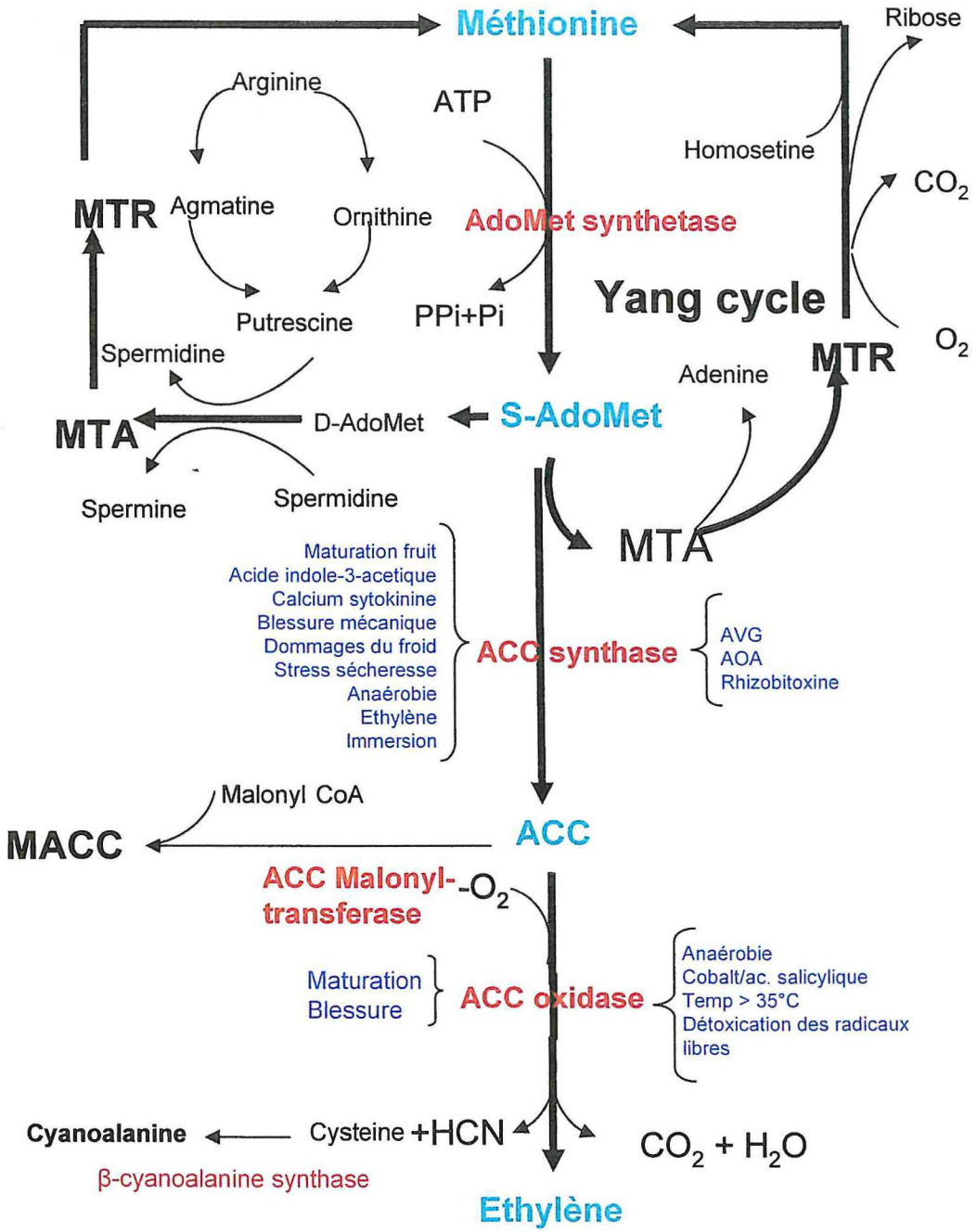

Figure 6. Voie de biosynthèse de l'éthylène et autres voies métaboliques reliées (Mathooko, 1996)

MTR : 5-methylthioribose
MTA : Methyl thioadenine
AdoMet : Adenosine L-methionine
D-AdoMet : D- Adenosine L-methionine
AVG : Amino ethoxyvinyl Glycine
AOA : Amino Oxyacetic acid
ACC : Aminocyclopropane carboxylic acid
MACC : Malonyl Aminocyclopropane carboxylic acid
HCN : Hydrogene Cyanure

Tableau 2. Résumé des acides aminés les plus importants pour la fonction et la structure de la protéine ACS chez *Lycopersicum esculentum*.

Acides aminés	Positions	Rôles
Lys	278	Site actif formant la base de Schiff avec la liaison au PLP dans l'enzyme non liée
Asn – Tyr	209...240	O_3 du cycle de la pyrimidine du PLP forme des liaisons avec 2 hydrogènes. Tyr^{240} attire le proton de Lys^{278} pour faciliter la formation de l'aldimine externe
Tyr	152	Stabilisation du cycle de la pyrimidine du PLP et de la fonction catalytique. Tyr^{152} effectue une attaque nucléophile pour casser la liaison C-γ-S ce qui conduit à la formation d'un intermédiaire te-ACC aldimine : le groupe OH de la Tyr^{152} est positionné respectivement à 3.7 et 3.5 Å du C-γd S de la SAM
Asp	237	Liaison hydrogène avec le N1 du PLP
Ala-Thr-Ser-Ser-Arg	127-128...275-277...286	Ces résidus (Ala^{127}, Thr^{128}, Ser^{275}, Ser^{277}, Arg^{286}) sont requis pour une orientation correcte du PLP dans le site actif pendant la formation de l'aldimine externe entre la SAM et le PLP (liaisons hydrogènes avec le phosphate oxygène du PLP)
Glu	55	Glu^{55} est impliquée potentiellement dans une interaction ionique avec la SAM au niveau du pôle sulfonium du (S,S)-diastéréomère de la SAM
Ala	54	Le groupe α-carboxylate de la SAM forme un pont hydrogène avec l'azote de l'Ala^{54} et le motif guanidine de l'arginine
Arg	157	Les atomes O en position 2 et 3 du sucre de la SAM forme des ponts d'hydrogène avec le motif guanidine de l'arginine
Pro-Tyr-Phe-Pro	26-27-28--153	Ces résidus contribuent à la formation d'une poche hydrophobique pour le cycle adénine de la SAM
Tyr	92	La Tyr^{92} est conservée chez toutes les ACS connus. Cela suggère que ce résidu soit impliqué dans la reconnaissance du substrat
Tyr	85	Nécessaire à l'activité de l'ACC synthase

Tableau 3. Liste non exhaustive des espèces pour lesquelles des gènes codant l'ACC oxydase ont été isolés

Espèces		Références
Riz	*Oryza sativa*	(Mekhedov & Kende, 1996)
Maïs	*Zea mays*	(Gallie & Young, 2004)
Bambou	*Phyllostachys edulis*	(Bhowmik & Matsui, 2005)
Canne à sucre	*Saccharum sp.*	(Wang *et al.*, 2003)
Bananier	*Musa parasidiaca*	(Do *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1997)
Papayer	*Carica papaya*	(Lopez-Gomez *et al.*, 2004)
Agrume	*Citrus sinensis*	(McCollum & Betz, 2000)
Melon	*Cucumis melo*	(Balague *et al.*, 1993)
Pommier	*Malus domestica*	(Dong *et al.*, 1992; Ross *et al.*, 1992)
Avocat	*Persea americana*	(McGarvey & Christoffersen, 1992)
Manioc	*Manihot esculenta*	(Reilly *et al.*, 2005)
Arabidopsis	*Arabidopsis thaliana*	(Reilly *et al.*, 2005)
Peuplier	*Populus sp*	(Andersson-Gunneras *et al.*, 2003),
Poirier	*Prunus persica*	(Andersson-Gunneras *et al.*, 2003; Lasserre *et al.*, 1996)
Pois	*Pisum sativum*	(Steed *et al.*, 2004),
Pétunia	*Petunia hybrida*	(Tang *et al.*, 1993; Wang & Woodson, 1992),
Rose	*Rosa hybrida*	(Ma *et al.*, 2005),
Oeillet	*Dianthus caryophyllus L.*	(Wi & Park, 2002)
Orchidée	*Phalaenopsis sp.*	(Lee & Huang, 1995; Nadeau *et al.*, 1993),
Kiwi	*Actinidia chinensis*	(MacDiarmid & Gardner, 1993),
Tomate	*Lycopersicum esculentum*	(Barry *et al.*, 1996; Holdsworth *et al.*, 1987; Koeck *et al.*, 1991; Nakatsuka *et al.*, 1998),
Tournesol	*Helianthus annus*	(Liu *et al.*, 1997),
Broccoli	*Brassica sp.*	(Yang *et al.*, 2003),
Persil	*Dryospiros kaki*	(Nakano *et al.*, 2003)
Pomme de terrre	*Solanum tuberosum*	(Zanetti *et al.*, 2002),
Ananas	*Ananas comosus*	(Ross *et al.*, 1992).

L'enzyme ACC oxydase (ACO) fait partie de la superfamille des oxygénases et des oxydases dont la plupart utilisent le Fe(II) comme co-facteur et le 2-oxoglutarate (2OG) comme co-substrat (Hamilton *et al.*, 1991). Les 2OG oxygénases sont impliquées dans de nombreuses voies de biosynthèse. Les 2OG oxygénases nécessitent le Fe(II) et catalysent une variété d'oxydation à 2 électrons incluant les hydroxylations, les désaturations et la fermeture des cycles oxydatifs. De manière inhabituelle pour cette superfamille, l'isopénicilline N synthase (IPNS) et l'ACO n'utilisent pas le co-substrat 2OG. L'ACO s'associe à 2 électrons (électron oxydation) de l'ACC pour former l'éthylène, du CO_2 et du cyanure (Adam & Yang, 1979).

Des expériences de mutagenèse dirigée ont permis de proposer différents rôles pour les résidus impliqués dans la catalyse de l'ACO incluant les ligands de liaison du fer, les différents résidus lysyl impliqués potentiellement dans la liaison de l'ascorbate, et ceux impliqués dans la liaison ACC carboxylate ou bicarbonate (Arg244, Ser246, Thr157) (Lay *et al.*, 1996). L'ACO a besoin du bicarbonate comme activateur pour catalyser l'oxydation de l'ACC en éthylène, CO_2 et HCN. La structure du cristal ACO a une forme d'apo de 2.1 Å, et forme un complexe de 2.55 Å avec le Fe(II) ou de 2.4 Å avec le Co(II). Le site actif contient un simple Fe(II) lié par 3 résidus His177, Asp179 et His234. Ce site est relativement ouvert par rapport à celui formé par les 2-oxoglutarate oxygénases. Il est supposé que la chaîne parallèle de Arg175 et Arg244 soit impliquée dans la liaison avec le bicarbonate et soit éloignée du site actif. Des changements de conformation pourraient lui permettre de rentrer à nouveau dans le site actif (Zhang *et al.*, 2004). La comparaison des séquences ACO, IPNS et ANS basée sur leur structure est présentée dans la Figure 7.

.

1.5.1.3. Autres enzymes impliquées dans la régulation de la production d'éthylène

La production d'éthylène est soutenue par la disponibilité en AdoMet *via* le cycle de la méthionine ce qui consomme de l'ATP (Figure 6). La régulation du taux de production d'éthylène se fait à l'étape de la formation d'ACC (Yang & Hoffman, 1984). L'enzyme clé qui régule le niveau d'éthylène est l'ACC synthase (Boller *et al.*, 1979), (Yu *et al.*, 1979). Par exemple, l'accumulation d'ACC est observée suite au stress au froid (Wang & Adams, 1982) ou l'utilisation de métaux lourds tels que le cadmium et le cuivre (Yu & Yang, 1980) ou encore au niveau de la réponse à la blessure (Hyodo *et al.*, 1985). L'induction de la production de l'éthylène par l'auxine (Abeles, 1966), a aussi été reliée à l'augmentation de la concentration en ACC (Yu *et al.*, 1979).

Translocation de l'ACC. Le niveau d'ACC est normalement bas dans les tissus végétatifs et est un facteur limitant de la production d'éthylène. Au-delà du rôle majeur de l'ACC synthase dans la catalyse de la production d'ACC, la teneur en ACC peut aussi être régulée par une translocation de l'ACC des racines vers les feuilles lors d'immersion de plants de tomate (Bradford & Yang, 1980), une inhibition de sa conversion en éthylène en phase anaérobie pour être transporté *via* le xylème vers des tissus en aérobie. Il existe aussi une voie de transport par la sève élaborée et entre l'ovaire et les pétales de fleur d'œillet (Reid *et al.*, 1984).

Formation de MACC. Le taux de production d'éthylène peut rapidement décliner soit par diminution de la synthèse d'ACC soit par conjugaison de l'ACC au malonyl pour former le MACC (Martin *et al.*, 1995). Il existe aussi une petite part de stockage sous forme de 1-γ-L-glutamylarnino –ACC (Martin *et al.*, 1995). La conversion de l'ACC en MACC est catalysée par l'ACC malonyltransférase (Yang *et al.*, 1990a). L'ACC ayant une ressemblance avec les acides aminés D ou L, l'ACC est pris pour substrat par cette enzyme dont la fonction normale

est l'inactivation de substances toxiques comme les acides aminés dextrogyres (Yang *et al.*, 1990b). Une fois formé, le MACC est stocké dans la vacuole (Bouzayen *et al.*, 1989). Sachant que l'ACC peut être lui aussi transporté dans la vacuole (Bouzayen *et al.*, 1987), ces deux formes, ACC et MACC, sont retrouvés dans cet organite cellulaire (Tophof *et al.*, 1989). Toutefois, le Km de la malonyltransférase est de 170 mM alors que celui de l'ACC oxydase est de 66 µM (Mansour *et al.*, 1986).

1.5.2. Signalisation éthylène

1.5.2.1. Perception et transduction du signal éthylénique

L'éthylène est perçue par une famille de récepteurs qui sont localisés sur les membranes du réticulum endoplasmique (Alonso & Stepanova, 2004), Figure 8 La liaison de l'éthylène à la poche hydrophobique des récepteurs se fait grâce à la présence d'un co-facteur, l'ion cuivre II.

Les cinq récepteurs qui ont été identifiés chez *Arabidopsis thaliana* constituent deux groupes types de récepteurs à activité histidine kinase (Klee, 2004).

Les récepteurs interagissent physiquement avec la Raf-like kinase CTR1. Lors de la liaison de l'éthylène à un récepteur, il se produit une inactivation du récepteur et de CTR1. Cela entraîne la dé- répression d'une molécule de régulation positive, EIN2, à travers une cascade de MAP kinases qui seraient impliquées dans la transduction du signal éthylénique entre CTR1 et EIN2.

Par un mécanisme encore inconnu, un signal positif est alors transmis par EIN2 à des facteurs de transcription de type EIN3/EILs. Il en résulte une stabilisation et par conséquence une accumulation des protéines EIN3/EIL dans le noyau. Les EIN3/EIL peuvent alors induire d'autres gènes codant des facteurs de transcription de type ERF (1) et EDF (1,2,3,4), qui eux-mêmes vont agir en coordonnant la transcription des gènes de réponse à l'éthylène. La régulation du niveau de EIN3 est effectué par 2 types de protéine, les F-box et les EBF1 et 2, dont la transcription est induite par l'éthylène (Figure 9) ; (Alonso & Stepanova, 2004), (Ecker, 2004).

1.5.2.2. Contrôle de l'action de l'éthylène

La production et la perception de l'éthylène peuvent être contrôlées par différents inhibiteurs :

Inhibiteurs de l'ACC synthase :
- AVG ou amino ethoxyvinyl glycine
- AOA ou aminooxyacetic acid

Inhibiteurs de l'ACC oxydase :
- AIB ou α-aminoisobutyric acid
- Cations (Co^{2+} ; Cu^{2+} ; Zn^{2+})
- SA ou acide salicylique
- Inhibiteurs sulfhydrile

Inhibiteurs de l'action de l'éthylène agissant sur les sites récepteurs :
- NRB ou 2,5-norbornadiène

- 1-MCP ou 1-méthylcyclopropène
- Ag^+ sous forme de thiosulfate d'argent ou de nitrate d'argent
- CO_2

Le 1-méthylcyclopropène (1-MCP) est un antagoniste non toxique de l'éthylène qui se lie au récepteur de l'éthylène (Sisler & Serek, 1999). Le 1-MCP est communément utilisé dans le cadre d'expériences sur le mûrissement des fruits climactériques et non climactériques. Ces études visent la compréhension des mécanismes physiologiques et biochimiques du processus de mûrissement retardé par le 1-MCP (Martinez-Romero *et al.*, 2003).

Le 1-MCP est appliqué commercialement pour inhiber l'action de l'éthylène sur la maturation des fruits (Apollo Arquiza *et al.*, 2005). Chez le poirier, les fruits traités au 1-MCP ont une respiration réduite et la production d'éthylène baisse en comparaison aux fruits non traités. Ce traitement retarde les changements qualitatifs du fruit mais des brûlures superficielles et un jaunissement de la peau des fruits sont observés. La durée de la réponse au 1-MCP dépend aussi de la concentration en cet inhibiteur. Quand les fruits traités au 1-MCP commencent à mûrir, le ramolissement et la production de composés volatiles sont comparables à ceux des fruits non traités. L'exposition à l'éthylène après stockage des fruits ne stimule pas la maturation des fruits préalablement traités au 1-MCP. L'efficacité du traitement éthylénique dépend donc de la concentration en 1-MCP et de la durée de stockage (Argenta *et al.*, 2003). Le 1-MCP inhibe aussi très fortement la production d'éthylène chez l'abricotier (Botondi *et al.*, 2003). Le 1-MCP inhibe l'accumulation des transcrits *CmACO1* induite par l'éthylène tandis qu'il n'affecte pas l'expression induite par la blessure chez le melon (Bouquin *et al.*, 1997). Un traitement au 1-MCP supprime la production d'éthylène et l'expression des gènes dépendant de l'éthylène chez le bambou (Bhowmik & Matsui, 2005). Le 1-MCP seul ou en combinaison avec le méthyl jasmonate (MJ) est capable d'inhiber la production d'éthylène. Le MJ et le 1-MCP inhibent la production de beaucoup de composés volatiles de type alcool ou ester (Fan *et al.*, 1997).

1.5.2.3. La blessure

La blessure est un stress très étudié notamment chez *Lycopersicon esculentum*. Les plants de tomate répondent à la blessure mécanique ou d'un insecte en induisant la synthèse d'un ensemble de protéines liées à la défense sur le site de la blessure et à travers toute la plante (Bergey *et al.*, 1996). La blessure provoque la libération et la mobilisation d'une hormone de type polypeptide de 18 acides aminés appelée systémine (Pearce & Ryan, 2003) ainsi que d'autres peptides de signalisation de la blessure (Ryan & Moura, 2002). La liaison de la systémine à un récepteur kinase à la surface cellulaire (Scheer & Ryan, 2002), cause une altération du transport d'ion (Schaller & Oecking, 1999), la formation de peroxyde d'hydrogène (Orozco-Cardenas & Ryan, 1999; Orozco-Cardenas *et al.*, 2001), l'activation de MAPK (Stratmann & Ryan, 1997), une augmentation du calcium intracellulaire et de calmoduline (Bergey & Ryan, 1999) et enfin une activation d'une phospholipase A_2 (Lee *et al.*, 1997; Narváez-Vásquez *et al.*, 1999). La phospholipase agit sur la membrane des cellules végétales en libérant de l'acide linolénique, lequel est converti en oxylipines biologiquement active, comprenant l'acide 12-oxo-phytodiénoïque et l'acide jasmonique (JA) *via* la voie des octadécanoïdes (Bergey & Ryan, 1999). En plus de la concentration élevée en oxylipines, la blessure induit la synthèse d'éthylène qui apparaît agir en synergie avec JA pour déclencher l'expression de gènes de défense (O'Donnell *et al.*, 1996).

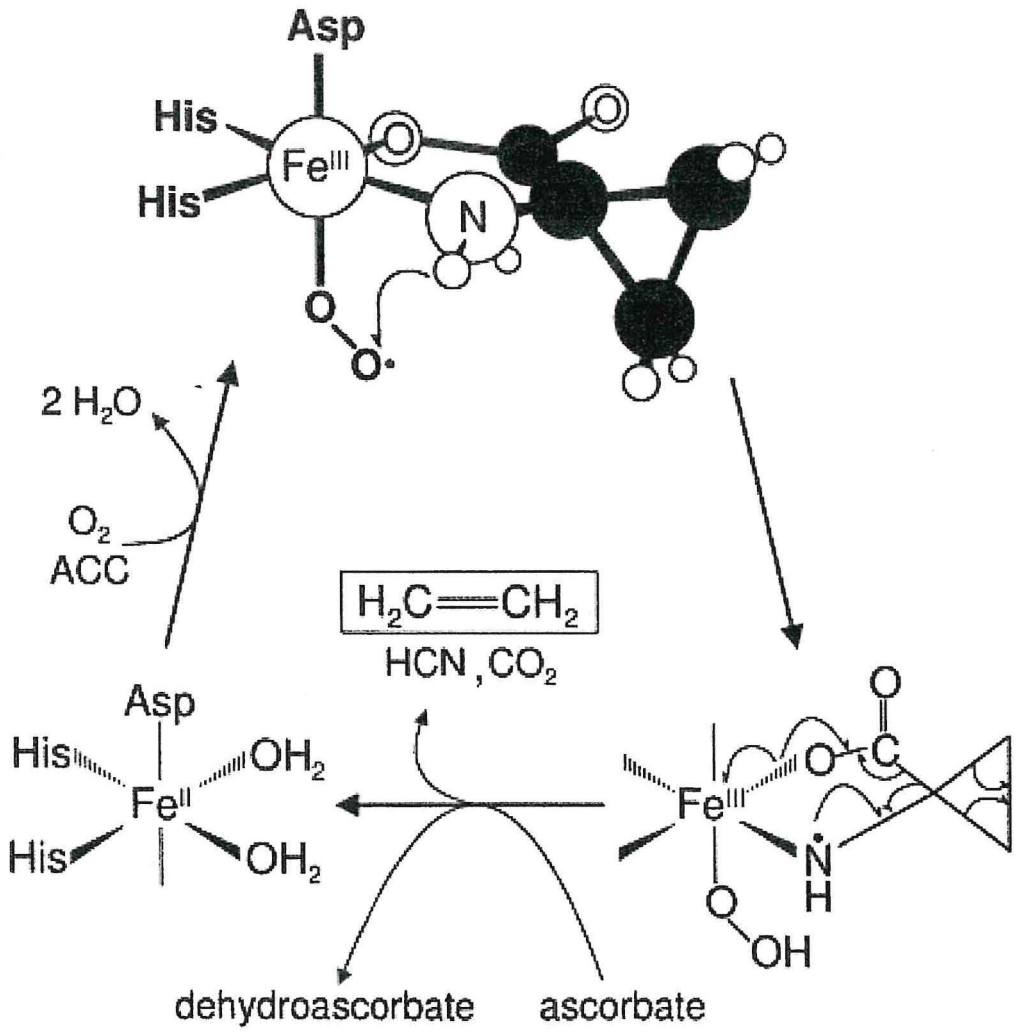

Figure 7. Structure tertiaire du complexe Fe(II)ACCO·ACC·O_2 et mécanisme catalytique.

De nombreux travaux montrent que la blessure est capable d'augmenter le niveau de production d'éthylène et des gènes de réponse à l'éthylène. Par exemple, deux phases de production d'éthylène sont observées après blessure des disques foliaires d'agrume. Le premier pic formé 15 minutes après excision diminue pendant 120 minutes puis un second se forme après 6h. La première augmentation d'éthylène s'accompagne de changement de l'expression du gène *CsACO1* qui est apparente en 30 à 60 minutes, mais l'éthylène n'a aucune action sur l'expression génique au niveau de disques foliaires (Katz *et al.*, 2005).

Chez les fruits de papayer, la blessure induit l'expression de *CpACO1* en 2 heures (Lopez-Gomez *et al.*, 2004). La production d'éthylène est induite en 8h après la blessure et s'accompagne d'une augmentation de l'activité enzymatique et l'accumulation d'ARNm de *pBA-ACS* et *pBA-ACO* (Bhowmik & Matsui, 2005).

Chez le melon, l'expression du gène *CmACO1* se fait très rapidement en 10 minutes dans les feuilles après traitement éthylénique ou blessure. La caractérisation de plants transgéniques de tabac comportant une fusion 5'-UTR du gène *CmACO1* avec le gène rapporteur codant la β–glucuronidase (GUS) montre qu'il existe deux régions du promoteur qui répondent à l'éthylène et à la blessure. Cela suggère que ce promoteur est régulé par 2 voies de signalisation séparées (Bouquin *et al.*, 1997).

1.6. ACTION DE L'ETHYLENE CHEZ *HEVEA BRASILIENSIS*

1.6.1. Découverte de l'action de l'éthylène sur la production de latex

L'amélioration des pratiques culturales a commencé dès la mise en place des grandes plantations d'hévéa. En sus des essais sur la saignée, diverses techniques ont été testées tels que le grattage de l'écorce par Kamerun en 1912 (d'Auzac, 1989b) ou l'application de différents produits : fumier (Baptist, 1955), huile (Beeley & Baptist, 1939), hormones (Chapman, 1951), CuSO4. Schweizer rapporte en 1928 que toutes sortes de stimulants ou de perturbations mécaniques influencent la formation des tissus et la régénération du latex (Dijkman, 1951). Parmi ces composés, l'application de 2,4-D et de 2,4,5-T a montré une bonne stimulation de la production (Baptist & de Jonge, 1955). De plus, l'acide 2,4 dichloro-5-flurophenoxyacetique a un effet bénéfique sur la régénération de l'écorce (Compagnon & Tixier, 1950 ; Lowe, 1964 ; Mainstone & Tan, 1964).

Ce n'est que dans les années 1955 à 1970 que l'effet de l'oxyde d'éthylène sur l'écoulement du latex est démontré mais avec un effet toxique (Taysum, 1961), qui est réduit lors de l'utilisation de l'acétylène (Banchi & Polliniere, 1969). L'action de gaz de type acétylène, éthylène ou Ethrel™ (CEPA : *2-chloroethane phosphonic acid*) s'avère réellement efficace sur la prolongation de l'écoulement et de ce fait sur l'augmentation de la production de latex (d'Auzac, 1989a). L'Ethrel apparaît ne pas endommager le renouvellement de l'écorce après la saignée, et rend ainsi possible son application en-dessous et au-dessus du panneau de saignée. Par la suite, les processus physiologiques qui conduisent à la stimulation de la production furent intensivement étudiés. De nos jours, c'est l'application de l'acide 2-chloroéthylphosphonique (CEPA ou éthéphon) qui a été retenue suite à la découverte révolutionnaire de Abraham en 1968 (Abraham *et al.*, 1968b) et de D'Auzac en 1969 (d'Auzac & Jacob, 1969).

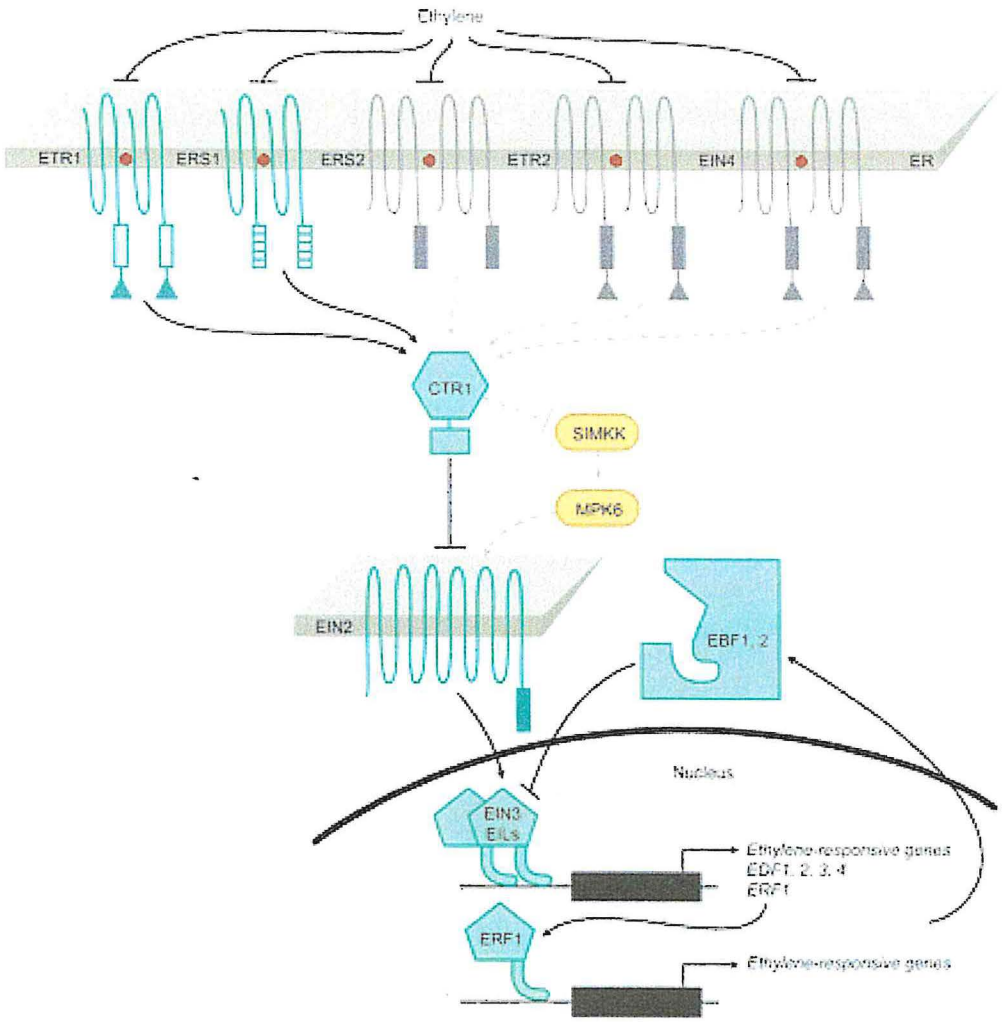

Figure 8. Représentation de la voie de transduction du signal éthylénique (Alonso et Stepanova, 2004).

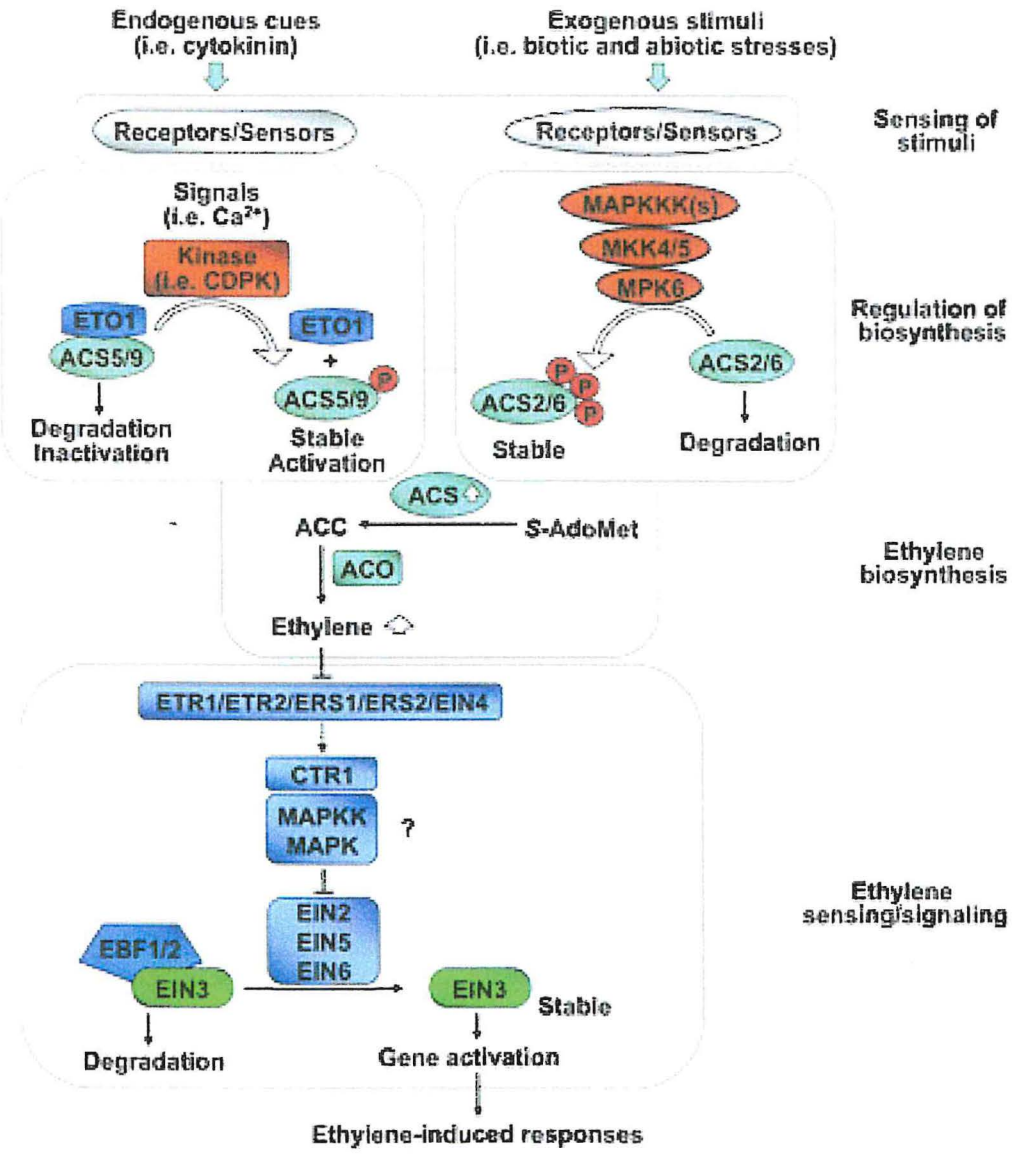

Figure 9. Modèle simplifié représentant l'induction de la voie de biosynthèse de l'éthylène et la voie perception-signalisation en aval (EckerJR.,2004).

1.6.2. Rôle de l'éthylène sur le fonctionnement des cellules laticifères

La stimulation à l'éthéphon peut augmenter de 20% à 100% la production de latex. Cet effet peut durer jusqu'à 3 mois (Chapman, 1951). Toutefois la réponse décroît au fur et à mesure des cycles de stimulation (Subronto, 1978). L'augmentation du volume de latex collecté n'est pas proportionnelle à la quantité de caoutchouc naturel obtenue. En effet, la stimulation diminue la teneur en caoutchouc naturel (*dry rubber content* ou DRC) de 2 à 7% (Paardekooper, 1989). Cela s'explique par une augmentation de la fluidité du latex par un appel d'eau par les laticifères.

La stimulation augmente l'activité invertasique, la teneur en saccharose et la stabilité du latex, mais décroît la teneur en amidon dans l'écorce (Chong, 1981). Toutefois, cela se fait sans modification des propriétés du caoutchouc (Kertowardjono *et al.*, 1976).

Les effets négatifs de la stimulation sont une baisse du DRC, l'apparition d'encoche sèche ou *tapping panel dryness* (TPD) et un ralentissement de la croissance de l'arbre. Cela peut être compensé par l'adoption de faibles fréquences de saignée qui a un effet marqué sur la circonférence du tronc (Paardekooper, 1989). Par contre, des études préliminaires ne montrent pas d'effet significatif de la stimulation sur les propriétés physiques du bois (RRIM, 1993).

L'étude de la biosynthèse de l'éthylène s'est avérée plus difficile à appréhender et peu de connaissances sont disponibles à ce jour. Il a été montré que l'application d'Ethrel induisait une synthèse endogène rapide d'éthylène représentant encore 9 jours après la stimulation près de 50% de l'éthylène total dosé (Siwei *et al.*). Cette expérience a été validée par une équipe indonésienne qui note un pic de production d'éthylène un jour après l'application d'Ethrel, la production d'éthylène endogène étant démontrée par une augmentation parallèle de la teneur d'ACC dans l'écorce (Sumarmadji, 1999). L'action de l'Ethrel sur la production de latex atteint son maximum 8 jours après la stimulation.

1.6.3. Quel modèle pour étudier la réponse aux stress d'exploitation ?

La complexité de la régulation des mécanismes mis en jeu lors de la saignée et de la stimulation par l'Ethrel a nécessité une réflexion sur la simplification du modèle d'étude.

Les **stress d'exploitation** ont été traduits de la façon suivante :

La saignée induit des stress à 3 niveaux : la blessure par elle-même, l'écoulement qui engendre un stress osmotique et la régénération du latex (cytoplasme) qui requiert une réactivation métabolique. L'action de la **blessure** a alors été ciblée comme sujet d'étude. Les connaissances fondamentales acquises sur la blessure font apparaître un rôle prépondérant de l'**acide jasmonique** et de sa signalisation dans la réponse à la blessure. Son rôle ne sera pas abordé dans cette thèse.

L'Ethrel™ ou l'éthéphon sont utilisés comme générateur d'**éthylène**. L'étude de l'action de l'éthylène est donc essentielle à la compréhension des mécanismes induits et coordonnés par cette hormone végétale.

Le **choix des clones** pour étudier la réponse aux stress dans le cadre des mécanismes liés à la production de latex s'est porté sur les clones PB 217, PB 260 et RRIM 600 qui représentent

des typologies métaboliques bien contrastés. Toutefois, dans le cadre de cette thèse, l'étude a porté sur le seul clone PB 260.

Des travaux préliminaires ont permis d'identifier un stade de **matériel végétal juvénile**, le **plant greffé avec une unité de croissance**, qui possède une bonne stabilité dans l'expression génique. Des études cytologiques et d'expression génique au cours du développement de l'hévéa ont été réalisées du stade cal embryogène à l'arbre mature exploité en passant par de jeunes vitroplants ou plants greffés (1, 2, 3 unités de croissance (UC) et arbres immatures non exploités). L'homogénéité des plants greffés à une UC au niveau de leur croissance et de leur différenciation tissulaire au sein de l'écorce permet d'appliquer différents traitements incluant des inhibiteurs métaboliques, et d'obtenir une réponse homogène sur le plan moléculaire. Cela en fait donc un outil indispensable à la bonne compréhension de l'action de l'éthylène et de la blessure.

L'hypothèse de départ de l'équipe CIRAD est que l'éthylène et la blessure coordonnent à la fois des voies métaboliques favorables et défavorables à la production de latex. C'est dans ce cadre que des travaux ont été entrepris sur la biosynthèse de l'éthylène.

1.6.4. Objectifs du projet de thèse

Bien que les voies de biosynthèse et de perception de l'éthylène ainsi que la transduction de ce signal soient bien décrites (Alonso & Stepanova, 2004; Bleecker & Kende, 2000; Chang & Bleecker, 2004; Chen *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2004; Stepanova & Alonso, 2005), la caractérisation biochimique et moléculaire des gènes de biosynthèse de l'éthylène et de leur régulation reste une entreprise délicate chez l'hévéa du fait des difficultés de mise en place d'un dispositif d'étude. La présence d'acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique (ACC) dans l'écorce porte à croire que la biosynthèse de l'éthylène interviendrait dans un tissu de l'écorce autre que les manteaux laticifères. La caractérisation de cette biosynthèse est donc l'étape initiale qui a été étudiée au niveau des gènes codant pour l'ACC synthase (*ACS*) et l'ACC oxydase (*ACO*).

L'éthylène joue un rôle prépondérant en hévéaculture. L'acquisition de connaissances sur la biosynthèse de l'éthylène, de sa perception et la transduction de ce signal chez l'hévéa est nécessaire pour identifier des voies d'amélioration de la production de latex et de contrôle des effets négatifs de cette hormone.

Cette thèse a pour objectif d'une part l'isolement et la caractérisation des différents membres des familles multigéniques codant les deux enzymes clés de la biosynthèse d'éthylène (ACC synthase et ACC oxydase) et d'autre part, l'analyse de leurs niveaux d'expression génique dans un système d'étude simplifié : cals embryogènes et/ou écorce de jeunes plants en relation avec l'application de différents effecteurs connus pour réguler la biosynthèse de l'éthylène ou la régénération du latex. Une méthode d'hybridation *in situ* a été développée pour permettre de localiser précisément les sites d'expression des différents gènes étudiés.

2. MATERIEL ET METHODES

2.1. MATERIEL VEGETAL

Etudes des différents stades de développement. Les expériences ont été réalisées sur le clone PB 260 à partir d'échantillons de cals friables embryogènes, de plantules, de jeunes plants greffés, et de fragments d'écorce d'arbres matures non-exploités et exploités. Les prélèvements de matériel végétal ont été effectués avant et après 24 heures de stimulation éthylénique (2% d'éthéphon dilués dans de l'eau à 0.1% de gélatine). Pour les arbres non-exploités, les prélèvements ont été réalisés à 0, 4, 8 et 24 h.

Expériences réalisées sur les jeunes plants greffés. Les plants greffés du clone PB 260 ont été cultivés jusqu'au développement complet de leur première unité.
L'application d'Ethrel^{TM} a été réalisée par application au pinceau sur les feuilles et les écorces d'une solution contenant 2,5% d'éthéphon et 0,1% de gélatine.
Le traitement « éthylène » a été réalisé par injection de 1 ppm d'éthylène dans un caisson étanche de 300 litres (120 cm x 50 cm x 50 cm) soit 1 mL éthylène pur pour 300 L, où a été introduit 24 heures avant un plant. Le caisson a été placé dans un sas ventilé à température et hygrométrie constantes et comparables à celles de la serre.
Le pré-traitement au 1-MCP, le méthylcyclopropène, a été employé comme inhibiteur de l'action de l'éthylène. Il consiste à maintenir les plants pendant 16 h dans une atmosphère à 1 ou 5 ppm de 1-MPC avant l'aération du caisson et l'injection d'éthylène. L'aération du caisson a été effectuée dans le sas, serre fermée pour éviter toute action de l'éthylène ou du 1-MCP sur les plants de la serre, et la porte extérieure de la serre ouverte pour ventiler le sas. Une ppm de 1-MCP a été préparée *ex temporis* à partir de 480 mg SmartFresh à 0,14% (Rohm & Haas, Philadelphia, USA) dans 7 mL d'eau. La solution a été placée à l'intérieur du caisson qui a été ensuite refermé pendant les 16 h de pré-traitement.
Le traitement « blessure » a été réalisé par pincement de toute la surface des feuilles à l'aide d'une pince crantée utilisée en culture *in vitro*, et par scarification annulaire tous les centimètres des écorces à l'aide d'un scalpel.

2.2. EXTRACTION D'ADN

L'ADN a été extrait par une méthode au MATAB à partir de 0,5g d'échantillon. Le broyage des échantillons a été réalisé dans un mortier rempli d'azote liquide jusqu'à l'obtention d'une fine poudre. Le broyat a été transféré dans un tube de 15 mL contenant 6 mL de tampon d'extraction incubés au préalable à 74°C. Puis, le tube a été incubé à 74°C pendant 60 minutes avec des agitations fréquentes. Après refroidissement à température ambiante, 6 mL de CIAA sont ajoutés dans le tube et mélangés par plusieurs inversions du tube. Le tube a été centrifugé à 6000 g pendant 15 minutes à température ambiante. Le surnageant a été transféré dans un tube de 13 mL dans lequel on ajoute 5 mL d'isopropanol. Après mélange par inversion, on peut recueillir avec une pipette Pasteur la pelote d'ADN formée et la transférer dans un microtube contenant 1 mL de tampon de reprise (Tris EDTA pH 8). Après resuspension de l'ADN, l'extrait a été conservée à -20°C.

2.3. EXTRACTION DES ARN TOTAUX ET SYNTHESE DES ADN COMPLEMENTAIRES

L'extraction des ARN totaux a été réalisée par la méthode sur coussin de césium. L'échantillon (1,5 g) a été broyé dans un mortier dans l'azote liquide. La broyat a été transféré dans un tube Falcon de 50 mL contenant le tampon d'extraction et homogénéisé au vortex un court instant (30 secondes). Le tube a été disposé dans la glace pendant 10 minutes en agitant toutes les 3 minutes. Ensuite, les tubes sont centrifugés pendant 30 minutes à 10000 g à 4°C. Le surnageant a été versé dans un tube d'ultracentrifugation contenant 8 mL de chlorure de césium. Avec le tampon d'extraction le volume dans chaque tube a été complété à 1 cm au-dessous du bord du tube. Les tubes sont positionnés dans un rotor de type SW28 Beckman et centrifugés pendant 20 heures à 20°C et la vitesse 25000 rpm. Le surnageant a été éliminé délicatement et le culot a été séché pendant 5 minutes. Le culot est lavé avec l'éthanol 70%, et laissé sécher pendant 1 heure avant d'être repris dans 200 µL d'eau stérile pour une conservation à –80°C. Les ADNc sont synthétisés à partir 2 µg d'ARNtotaux des différents tissus étudiés. La rétrotranscription a été réalisée avec le Kit RevertAid ^{TM} M-MuLV Reverse Transcriptase (Fermentas) et un poly-T ancré de type Oligo $(dT)_{12}VN$.

2.4. CLONAGE ET SEQUENÇAGE D'ADN COMPLEMENTAIRES

Des amorces dégénérées ont été définies à partir d'alignement des régions conservées dans les séquences des gènes codant l'ACO publiées dans la base de données NCBI (Tableau 4). Après amplification PCR, les produits de réaction sont clonés dans le vecteur pGEM T easy vector (Promega). Pour cela à 3 µL de produits de PCR sont rajoutés à 5 µL de tampon de ligation 2x, 1 µL de T4 DNA Ligase et 1 µL de vecteur pGEM-T fourni dans le Kit. Après mélange par pipetage, la réaction a été maintenue à 4°C pendant 1 nuit. Les produits de ligation sont incorporés par transformation dans des cellules compétentes DH5-alpha : 5 µL de produits ligation sont mis dans un tube Falcon de 10 mL, et laissés sur glace pendant 5 minutes. Des bactéries (50 µL) ont été rajoutés au-dessus de produits de ligation sans agitation. Le tube a été laissé sur glace pendant 30 minutes. Ensuite, le tube a été mis à 42°C pendant 45 secondes, et remis sur glace tout de suite pendant 2 minutes. 900 µL de la solution SOC sont alors rajoutés dans le tube, lequel a été mis sous agitation à 37°C pendant 1 heure. Une partie de la solution (200 µL) a été étalée sur un milieu de culture LB-agar contenant de 50 mg/L d'ampiciline, 80µg X-Gal et 0,5 mM IPTG, puis incubés à 37°C pendant 1 nuit. Les colonies blanches sont piquées avec un cure-dent stérile qui permet d'inoculer 10 µL d'eau Merck contenus dans un puits de plaque multipuits. Ensuite, le même cure-dent est utilisé pour ensemencer 150 µL de la solution de LB contenant 5 % de glycérol et 50 mg/L d'ampicilline dans un puits de plaque multipuits. La réaction de PCR a été initiée dans des conditions standard avec les amorces T7 et SP6 pour amplifier l'insert cloné dans le vecteur pGEM. Les produits PCR sont séparés par électrophorèse d'agarose 1% dans TAE 1x et les clones positifs sélectionnés d'après la présence d'insert ayant la taille de bande attendue. Parallèlement, les plaques bactériologiques sont incubées sous agitation à 37°C pendant 1 nuit puis conservées à -80°C. Enfin, les colonies bactériennes sélectionnées sont envoyées à *Genome Express* pour séquençage. Le séquençage a été réalisé à partir de l'amorce T7. Les séquences obtenues ont été vérifiés par comparaison avec les données de séquences de la base de données NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) utilisant les analyses BlastX puis BlastN. Des amorces spécifiques du gène étudié ont été définies à l'aide du logiciel Vector NTI.

Tableau 4. Liste des amorces dégénérées définies à partir de régions conservées au niveau de la séquence codante en vue d'amplification d'ADNc et d'ADNg des gènes *ACS* et *ACO* chez *H. brasiliensis.*

Noms amorces	Tm (°C)	Séquences	Nb bases	Auteurs
ACO				
ACO-S	52.44	5'-GAT-GCN-TGY-SAR-AAY-TGN-GGN-TT-3'	23	Mbéguié, 2000
ACO-AS	53.8	5'-TTC-ATN-GCY-TCR-AAN-CKN-GGC-TC-3'	23	Mbéguié, 2000
ACO-D1-F1	50.76	5'-TGY-GAR-AAY-TGG-GGN-TTY-TTY-G-3'	22	Montoro, 2003
ACO-D1-F2	52.44	5'-RAY-GYN-TGY-GAR-AAY-TGG-GGN-TT-3'	23	Montoro, 2003
ACO-D2a-F	59.27	5'-GGN-CTN-CGN-GCN-CAY-WSN-GAY-GC-3'	23	Montoro, 2003
ACO-D2b-F	56.02	5'-GCN-CAY-WSN-GAY-GCN-GGN-GG-3'	20	Montoro, 2003
ACO-D3b-R	51.29	5'-TCR-AAN-CGN-GGY-TCY-TTN-GC-3'	20	Montoro, 2003
ACS				
OLE2	57.17	5'-GCT-CTA-GAT-AYT-TYG-AYG-GNT-GGA-ARG-C-3'	28	Mason & Botella, 1997
OLE4	54.52	5'-GCG-AAT-TCR-TCC-ATR-TTN-GCR-AAR-CA-3'	26	Mason & Botella, 1997
OLE5	55.7	5'-CCT-GAT-CAR-ATG-GGN-YTN-GCN-GAR-AA-3'	26	Mason & Botella, 1997
OLE6	57	5'-CTC-TGC-AGC-RAA-RCA-NAC-NCK-RAA-CCA-3'	27	Mason & Botella, 1997
ACS1F	50.8	5'-AYC-CWT-SWA-ATC-CAY-TRG-GNA-C-3'	22	El Sharkawy, 2001
ACS2F	49.7	5'-ATG-GGY-YTN-GCD-GAR-AAY-CA-3'	20	El Sharkawy, 2001
ACS1R	46.6	5'-ACW-ARN-CCR-AAR-CTN-GAC-AT-3'	20	El Sharkawy, 2001
ACS2R	44.1	5'-CCR-TGR-TAR-TCY-TGR-AA-3'	17	El Sharkawy, 2001
ACR3R	56.6	5'-GCC-AAG-CTT-RAA-CCA-NCC-NGG-CTC-3'	24	El Sharkawy, 2001
ACSD1F	52.9	5'-AAR-GAY-MTN-GGN-CTN-CCN-GG-3'	20	Montoro, 2003

Tableau 5. Liste des amorces spécifiques définies à partir des séquences partielles des gènes *ACS* et *ACO* chez *H. brasiliensis*

Noms	Séquences	Tm (°C)	Nb bases
AcsF3-S	ATAT GGGG CTAC CGGG GTGG TT	64	22
AcsF3-R	TGGC GCAA GTCC ATCC AAAC	64	20
AcsF2-S	AACC ATCC GGGC TCCT TGCA	70	20
AcsF2-R	ATTG GGCT GCCA GGCT TCAG	62	20
AcsF10-S	CCAT CCAG GCTC GCCA AGCT TAA	72	23
AcsF10-R	ACCG GGCT CTGT GCAA TGGA	64	20
AcsD10-S	AGGA AGAG GGGA TAGA GTAA CG	66	22
AcsD10-R	CTCT TCTT GCTT TGCA TGAT G	60	21
AcsE4-S	GCCG AAAC TTGA CATC TTGC GA	66	22
AcsE4-R	CATT CACT TGGT CGCA GACG	62	20
AcoH4-S	TCAT TGCT TCGA ACCG GGGC	64	20
AcoH4-R	AAAG CACC TTCT TCCT CCGC CACC	76	24
AcoH5-S	TTCA TGGC TTCG AAAC GGGG	64	20
AcoH5-R	GGGC GAGA ATCT TGGG TTGG	62	20
AcoO4.3-S	CTGG GGGT TTTT CGAG TTGG TG	68	22
AcoO4.3-R	GGGA TTTC TGCC ATGT TGGA	60	20
AcoO4.8-S	GGAA GGTG ATGA AGGA GTTT G	62	21
AcoO4.8-R	TGCA TCAC TTCC AGGG TTGT	60	20

2.5. ISOLEMENT DES CLONES PLEINES LONGUEURS

2.5.1. Criblage de banques phagiques d'ADNc

Isolement d'ADNc pleines longueurs par criblage de banque d'ADNc phagique. Après amplification de fragments spécifiques de l'hévéa et leur clonage puis vérification par séquençage, ces fragments ont été utilisés comme sonde pour le criblage de banques phagiques d'ADNc afin d'isoler des ADNc pleines longueurs des gènes recherchés (Tableau 5).

Une première banque phagique d'ADNc isolés à partir de méristèmes caulinaires d'hévéa a été testée. Pour la titration de la banque mère, 7 petites boîtes de Pétri contenant 25 mL de LB solide ont été préparées. Les bactéries XL-Blue ont été ensemencées dans 10 mL de LB liquide contenant Tétracycline 10 mg/l jusqu'à avoir la OD_{600} = 0.5. La banque mère a été diluée dans la solution SM à 10 jusqu' à 10^7 fois. Pour l'étalement de la banque, 15 mL ont été rajoutés à 10 µL de suspension phagique, 200 µL de suspension bactérienne à la DO_{600} = 0,5 dans la solution, avant incubation à 37°C pendant 15 minutes. Ensuite, 3 mL de Top agar refroidi à 48°C ont été rajoutés et le tout bien mélangé et étalé tout de suite dans une boîte de Pétri préparée et préchauffée. Les boîtes sont incubées à 37°C pendant 1 nuit, les plages de lyse sont comptées et la densité de banque a été déterminée. L'étalement de la banque de phage pour le criblage a été fait dans 3 boîtes carrées (25.4 cm x 25.4 cm, Bioassay Dish) contenant 200 mL de milieu NZY qui a été préparé deux jours par avance. Pour ce criblage, 500.000 pfu ont été étalés dans 3 boîtes sachant que le titre de la banque amplifiée était de 1.04 x 10^6 pfu/ µL. Le phage a été dilué avec la solution SM, et après avoir bien mélangé a été partagé à 3 flacons de 50 mL. Dans chaque flacon a été rajouté la suspension de bactérienne ayant atteint une DO=0.5, bien mélangé et incubé à 37°C pendant 15 minutes. En attendant, le top agar a été préparé et fait refroidir à 48°C. Les phages sont mélangés avec le top agar par agitation ou inversion pendant 15 secondes et ensuite étalé sur les boîtes carrées. Ces boîtes sont incubées à 37°C pendant 1 nuit. Le jour suivant, les phages de lyse ont été transférées sur membrane Hybond N^+. Pour cela les solutions de dénaturation, neutralisation et lavage sont préparées. Des papiers 'Whatman' imbibés avec chaque solution et posés sur une plaque. Les boîtes de phages sont conservées dans un réfrigérateur pendant 2 heures. Une membrane a été posée sur l'agar pendant 5 minutes, et ensuite elle a été placée sur un milieu de dénaturation pendant 5 minutes, puis de neutralisation pendant 3 x 3 minutes, puis rincée pendant 30 secondes et séchée. Un transfert des plages de lyse a été effectué sur deux membranes réalisées successivement pour chaque boîte de Pétri. Des marqueurs précis sont placés simultanément sur la boîte et la membrane pour positionner les plages de lyse. La fixation des ADN phagiques a été ensuite faite sous UV (Stratalinker). L'hybridation des membranes avec les sondes a été faite en utilisant le protocole d'hybridation de type *Southern*. La même méthode de criblage a été utilisée avec une deuxième banque phagique d'ADNc isolés à partir d'écorce (titre de 4.48 x 10 8 pfu/µL) étalée à raison de 30 plages par cm^2 comme décrit précédemment.

2.5.2. Extension des fragments partiels par RACE-PCR

Isolement d'ADNc pleines longueurs par extension des fragments partiels par 5' et 3' RACE. Une autre approche a consisté à étendre en 5' et en 3' par RACE-PCR les fragments partiels initialement obtenus (Kit BD Bioscience Clontech, BD SMART RACE cDNA Amplification Kit, USA). Des couples d'amorces ont ainsi été définies (Tableau 6). Après

assemblage d'un ADNc pleine longueur à partir des données de séquences, des amorces sont définies aux deux extrémités de l'ADNc pour amplifier puis cloner l'ADNc pleine longueur correspondant (Tableau 7).

Tableau 6. Amorces spécifiques définies à partir des séquences partielles pour l'extension de ces fragments en 5' et en 3' par la technique de RACE- PCR

Nom des amorces	Séquences 5'-3'	Extrémités	Longueurs	Tm (°C)
HbAcsD10race5-R1	GCATCGCCGGGATCTGCCAAGCAC	5'	24	80
HbAcsD10race5-R2	CATGACAATGCGGTCAGGGTCAAACG	5'	26	80
HbAcsD10race3-S1	GGAGAGTGATAATTAACGATGTCAAGC	3'	25	76
HbAcsD10race3-S2	CAATGGTTCCGCCAGGTTCTTCTTTCC	3'	27	82
HbAcsE4race5-R1	GGACAGGGAGACCTTAAAAGACTTGGTG	5'	28	84
HbAcsE4race5-R2	CCTGGCTTCAGAGTTGGCATCGTTTA	5'	26	78
HbAcsE4race5-R3	ATAACGATGAAGTCGTCAGGTGCGG	5'	25	76
HbAcsE4race3-S1	CCTTTGAAAGGCTGTAAACAATGTG	3'	25	70
HbAcsE4race3-S2	CCTGGTGAACTGAACACGGTACCCG	3'	25	80
HbAcsE4race3-S3	GGTTCAATTCACTTCGGCTCATTGTAG	3'	27	78
HbAcsF3race5-R1	GCTAGGGGAGCTGAAGATGGTAGCTGC	5'	27	86
HbAcsF3race5-R2	TGAACCACCCCGGTAGCCCCATA	5'	23	74
HbAcsF3race3-S1	CGAAGGGGAAATGGCTCTGTGGA	3'	23	72
HbAcsF3race3-S2	CCAAGTGAAGCTCAATGTTTCGCC	3'	24	72
HbAcsF2race5-R1	GGCTCTGTGGAGGGTGATTATTTACC	5'	26	78
HbAcsF2race5-R2	CAAGTGAAGCTCAATGTTTCGCCG	5'	24	72
HbAcsF2race3-S1	TAAACGATGCCAACTCTGAAGCCTGG	3'	26	78
HbAcsF2race3-S2	CAGCCCAATGTCCTTAGACAAGC	3'	23	70
HbAcsF10race5-R1	CGAGCACAGCTCACAACTGCATCATT	5'	26	78
HbAcsF10race5-R2	TCCTACTCTAAATCCAGGCAGGC	5'	23	70
HbAcsF10racer3-S1	GCAGACGGTTGCAGGGGAGCTTG	3'	23	76
HbAcsF10race3-S2	CGATGTCAAGCTCAATGTTTCGCC	3'	24	72
HbAcoH4-R1-69	CAACTGTGTCCATGAACTCTGGCTCT			
HbAcoH4-R2-98	TTTCCTGTAGTGACCCTTTGTCATCC	5'		
HbAcoH4-R3-181	TCCCAATCCATATCTTTGATCTCAGT			
HbAcoH4-R4-330	CAAGATTCTCACACAACAGGTCTAAG			
HbAcoH4-S1-283	TGGAGAAACTGGCCGAGGAGCTCTTA	3'		
HbAcoH4-S2-724	AAGAAGCAGAGGAGAAGAAGCAAGTC			
HbAcoH4-S3-799	AATTCCAGCCCAAGGAGCCCCGGTTC			
HbAcoO48-R1-63	ACAGGTCCAGAAGCTCCTCTGCAAGC	5'		
HbAcoO48-R2-78	CAAGATTTTCACATAACAGGTCCAGA			
HbAcoO48-R3-557	CAAAGAACCACGCTTTGAAGCACTAG			
HbAcoO48-S1-483	CAGAAGAAGCTGGTGTACCCAAAATT			
HbAcoO48-S2-121	GGGGTCCAACCTTTGGGACCAAGGTG	3'		

Tableau 7 . Amorces utilisées pour l'amplification des ADNc et ADNg pleines longuers (Amorces aux extrimité 5' et 3')

Noms des amorces	Séquences 5'-3'
H4-ext-5'	ACGCGGGGGTCTCAACAAGCACAA
H4-ext-3'-R1	TTAGAAGTAAAACACATATT
H4-ext-3'-R2	TTAAAACTAAGTGAGGCAAA
H5-ext-5'	CAGAGACAAGTTTAATTTAG
H5-ext-3'	TTAGACCAAACTTTCGGCAT
O48-ext-5'	ACGCGGGGAACAAACACAAGGCA
O48-ext-3'	TTGATAATATTAAACAACAC
D10-ext-5'	CTCTCTACATATAAGTACTTGA
D10-ext-3'	TTGGAAAGAGCCTTAATGCTAT

2.6. ETUDE DE L'ACCUMULATION DES ARN MESSAGERS PAR RT-PCR SEMI-QUANTITATIVE

Choix des contrôles. Un gène d'hévéa (*ACTIN*) codant l'actine a été utilisé comme contrôle interne à la fois de la stabilité du niveau d'expression dans les différentes populations d'ARN (ADNc simple brin) et de la présence de contamination d'ADN dans les extraits d'ARN. Des gènes de référence ont aussi été utilisés pour s'assurer de l'efficacité du traitement notamment éthylénique. Ainsi l'expression des gènes *HEV* et *REF*, codant respectivement l'hévéine et le facteur d'élongation du caoutchouc, connus pour leur réponse à l'éthylène, a systématiquement été testée sur les extraits d'ARN totaux.

Choix des amorces. Les amplifications à partir des ADNc simples brins ont été réalisées par multiplexage (amorces du gène étudié et de l'actine) avec des nombres de cycles différents et adaptés au niveau d'expression de chacun. Ainsi, les amorces des gènes d'intérêt ont été définies afin d'obtenir un produit PCR de taille différente de celui de l'actine facilement différencié sur le gel. Disposant d'amorces spécifiques pour l'amplification d'un fragment d'actine d'hévéa de 260 pb, des amorces spécifiques pour l'amplification d'un fragment de 500 pb ont été définies pour chacun des membres *ACS* et *ACO* isolés. Etant donné leurs similitudes de séquences dans la partie codante, une amorce spécifique a été définie dans le 3'UTR et l'autre dans la partie codante ayant au moins une base de différence en 3' (Tableau 8).

Vérification de la spécificité des amorces pour les gènes étudiés. Chacun des couples d'amorce a été testé par PCR utilisant indépendamment les différents gènes étudiés comme matrice afin de s'assurer de la spécificité d'amplification pour chaque membre des familles multigéniques.

Synthèse des ADNc simples brins. Cette synthèse a été réalisée à partir de 2 µg d'ARN total, la M-MLV *reverse transcriptase* et l'oligo(dT)18 dans un volume final de 20 µL. Ensuite, l'amplification PCR se poursuit avec 1 µL d'ADNc simple brin et les amorces spécifiques pour chacun des gènes étudiés.

Définition du nombre de cycles nécessaire pour avoir une amplification non saturée. Différents nombres de cycle ont été testés entre 15 et 25 pour les gènes *ACO* fortement exprimés et entre 25 et 35 cycles pour les *ACS* faiblement exprimés afin de pouvoir comparer les différents niveaux d'expression dans différents tissus de la plante pour un même gène. Une analyse de l'intensité des bandes obtenues sur gel par un analyseur d'image a permis d'évaluer les niveaux d'expression directement.

L'analyse des ARN a comporté les étapes suivantes :
- Vérification de l'absence de contamination d'ADN génomique dans les extraits d'ARN.
- Traitement à la DNase des ARNm
- Amplification de l'actine pendant 40 cycles d'amplification sur les extraits d'ARN traités et les contrôles (eau et ADNc).
- Amplification en multiplexage
- Initiation de la PCR avec le gène (actine ou gène étudié) ayant le plus grand nombre de cycles.
- Ajout au cours de la réaction dans la PCR des amorces pour le gène ayant le plus petit nombre de cycles.

- La réaction PCR consiste généralement en :
1 cycle de dénaturation de 3 minutes à 94°C

18 à 28 cycles d'amplification de : 30 sec à 94 °C – 1 min à 55 °C – 1 min à 72 °C
1 cycle d'extension de 7 min à 72 °C.
Les produits PCR sont séparés par électrophorèse en gel d'agarose.
La quantification des intensités des bandes d'expression a été effectuée, après capture numérique des images des gels, au logiciel ImageQuant (Molecular Dynamics).

Etude de l'expression des gènes ACO dans différents tissus. La technique de RT-PCR semi-quantitative a été utilisée pour étudier l'expression des gènes dans différents tissus et organes. Le gène codant l'actine a été utilisé comme le témoin interne d'expression. Des conditions de PCR ont été déterminées pour calibrer l'expression du gène de l'actine avec une quantité d'ARN donnée.

Tableau 8. Amorces utilisées pour l'amplification par RT-PCR semi-quantitative

Noms des amorces	Séquences	Tailles de produit PCR attendu (pb)
H4-$S_{5'ext}$	ACGCGGGGGTCTCAACAAGCACAA	510
H4-$R_{330\text{-}5'RACE}$	CAAGATTCTCACACAACAGGTCTAAG	
H5-S_{692}	GGCGACCAACTTGAGGTAAT	379
H5-R_{1071}	TCAATCAGTAACTTCATCAT	
O48-$S_{483\text{-}3'RACE}$	CAGAAGAAGCTGGTGTACCCAAAATT	524
O48-R_{1007}	TTGATAATATTAAACAACAC	
HbAcsD10-3'race-S2	CAATGGTTCCGCCAGGTTCTTCTTTCC	667
HbAcsD10-ext-3'	TTGGAAAGAGCCTTAATGCTAT	
Actin-S	TCCATAATGAAGTGTGATGT	260
Actin-R	GGACCTGACTCGTCATACTC	

2.7. CONCEPTION D'UN CAISSON POUR L'APPLICATION DES TRAITEMENTS GAZEUX ET CARACTERISATION DES EFFETS INDUITS

Afin d'étudier les effets de l'éthylène et d'un de ces inhibiteurs, le 1-MCP, un caisson en plexiglas a été construit pour contenir une plante (Figure 10). Préalablement aux études d'expression génique, les effets induits par ce dispositif expérimental ont été étudiés à travers la mesure des échanges gazeux (concentrations en C_2H_4 ; O_2 ; CO_2) (Tableau 9).

Cette étude montre que :

- le caisson en Plexiglas ne libère pas d'éthylène ;
- une légère baisse de la teneur en gaz éthylène peut traduire soit une fuite au niveau de la porte du caisson soit une adsorption de ce gaz par les parois du caisson ;
- le terreau ne dégage pas d'éthylène ;
- le terreau peut représenter une source d'adsorption de l'éthylène mais la très légère baisse de la concentration en éthylène à 24 h est comparable à celle observée pour le caisson seul ;
- la cinétique de production d'éthylène, d'oxygène et de dioxyde de carbone par la plante non traitée n'a pas pu être déterminée ;
- la plante traitée préalablement à l'Ethrel 2,5 % libère jusqu'à 1,2 ppm d'éthylène en 24 h. On ne note pas par ailleurs de modification des échanges gazeux (teneurs en oxygène et en dioxyde de carbone comparable à celle de l'atmosphère de départ ;

- enfin, lorsque l'on met une plante sous une atmosphère de 5 ppm d'éthylène, on peut observer une baisse de la concentration en éthylène comparable à celle du caisson avec éthylène sans plante.

En conclusion, le caisson peut être utilisé pour traiter des plantes à l'éthylène gaz. Il ne semble pas y avoir d'effet notable sur les échanges gazeux sur une période de quelques jours. La **libération d'environ 1 ppm d'éthylène par une plante traitée par 2,5% d'Ethrel** suggère que le traitement à l'éthylène gaz soit équivalent à 1 ppm pour avoir les mêmes niveaux d'induction. La légère fuite d'éthylène au cours du traitement en caisson sera évaluée par des dosages quotidiens et compensée par réajustement de la concentration initiale en éthylène dans le cas des études en cinétique sur une période de 7 jours.

Le dosage de l'éthylène endogène étant plus difficile à appréhender, le dosage de son précurseur, l'ACC, a été réalisé.

Figure 10 . Caisson étanche utilisé pour l'application des traitements gazeux

Tableau 9. Effet du caisson, du terreau, de la plante et de l'éthylène sur la concentration en gaz (C_2H_4 ; O_2 ; CO_2) dans le caisson de culture.

Traitements dans caisson			Concentrations dans le caisson		
Traitements	Concentrations	Durées (heures)	C_2H_4 (ppm)	O_2 (%)	CO_2 (%)
Aucun	0	0	0	21	0
		24	0	21	0
Ethylène	10 ppm	0	9,2±0,3	ND	ND
		1	9,2±0,5	ND	ND
		4	9,3±0,3	ND	ND
		24	8,0±0,7	ND	ND
		48	6,5±0,8	ND	ND
Terreau		0	0±0	ND	ND
		1	0±0	ND	ND
		4	0±0	ND	ND
		8	0±0	ND	ND
		24	0±0	ND	ND
Terreau + Ethylène	10 ppm	0	9,84±0,03	ND	ND
		1	9,62±0,05	ND	ND
		4	8,89±0,14	ND	ND
		8	9,01±0,06	ND	ND
		24	8,44±0,02	ND	ND
Plante		0	ND	ND	ND
		1	ND	ND	ND
		4	ND	ND	ND
		8	ND	ND	ND
		24	ND	ND	ND
Plante + Ethrel	2,5 %	0	0±0	21,1±0,0	0±0
		1	0±0	21,0±0,0	0±0
		4	0,6±0,1	20,7±0,0	0±0
		8	0,9±0,1	20,9±0,0	0±0
		24	1,2±0,1	20,9±0,1	0±0
		48	0,4±0,0	21,0±0,1	0±0
		72	0,1±0,0	21,0±0,1	0±0
Plante + Ethylène	1 ppm	0	1,00±0,05	ND	ND
		1	0,90±0,01	ND	ND
		4	0,90±0,04	ND	ND
		8	0,80±0,01	ND	ND
		24	0,60±0,03	ND	ND
Plante + Ethylène	5 ppm	0	4,70±0,0	ND	ND
		1	4,80±0,05	ND	ND
		4	4,60±0,05	ND	ND
		8	4,70±0,05	ND	ND
		24	3,80±0,03	ND	ND

2.8. DOSAGE D'ACC

2.8.1. Méthode de dosage de l'ACC

L'ACC a été dosé par la méthode de McKeon modifiée (McKeon *et al.*, 1982). Un gramme de tissu congelé dans l'azote liquide a été broyé dans un mortier. La poudre a été récupérée dans 5 mL d'éthanol absolu, puis extraite deux fois avec de l'éthanol 80% dans un bain-marie à 70°C pendant 30 minutes. Les deux extraits ont été mélangés et séchés dans le 'SpeedVac' pendant 5 heures à 30°C. Le culot sec a été repris dans 0,5 mL de chloroforme. L'ACC a été finalement extrait en rajoutant 2,5 mL d'eau, et centrifugé à 2500 g pendant 10 minutes. La teneur en ACC dans la solution aqueuse a été déterminée par conversion chimique de l'ACC en éthylène selon la méthode de Lizada et Yang (Lizada & Yang, 1979). Pour cela, 500 µL d'extrait sont mélangés avec 4 µmol $HgCl_2$ (Sigma-Aldrich) dans un volume final de 1800 µL complété avec de l'eau puis mis dans la glace. Après avoir rajouté 200 µL d'un mélange contenant 5% de NaOCl (Sigma-Aldrich) et du NaOH saturé (2 :1, v/v), le tube a été fermé immédiatement, agité avec le Vortex pendant 10 secondes puis mis dans la glace pendant 2 minutes. Le tube a été à nouveau agité avec le Vortex pendant 10 secondes avant de récupérer 1 mL de gaz pour le dosage de l'éthylène par chromatographie en phase gazeuse.

2.8.2. Dosage d'ACC dans les écorces et les feuilles

Des plantes ont été traitées avec environ 1 ppm d'éthylène sur une cinétique de 7 jours (0, 1, 4, 8, 24, 48, 96 et 168 heures). Plusieurs dosages ont été effectués à partir de feuilles et d'écorces. Les résultats sont décrits dans les Tableau 9 et Tableau 10.

Les concentrations enregistrées sont très faibles et en-dessous du seuil de détection de la méthode. Nous pouvons mesurer une production d'ACC seulement après 24 h de stimulation dans les écorces. Il est généralement rapporté de faibles teneurs en ACC du fait de sa rapide métabolisation en éthylène, réaction catalysée par l'ACC oxydase. L'accumulation d'ACC à 24 h dans les racines peut mettre en évidence une prédominance de l'activité ACS par rapport à l'ACO. D'autre part, la conjugaison de l'ACC par malonylation pour son stockage dans la vacuole ne pouvant intervenir que pour des fortes concentrations (Mansour *et al.*, 1986), nous pensons qu'il s'agit ici plutôt d'une régulation des enzymes de biosynthèse de l'éthylène. Les mesures d'expression génique réalisées dans ce travail seront des indicateurs sur la régulation de la concentration en ACC dans la cellule.

Tableau 10. Concentration en ACC mesurée dans des écorces et des feuilles traitées avec de 1 ppm d'éthylène. Trois mesures ont été réalisées par traitement. Les concentrations en ACC sont obtenues par un dosage indirect de l'éthylène par la méthode non enzymatique de Lizada et Yang (Lizada & Yang, 1979).

Organes	Teneur d'ACC (nmol/g)							
	0 h	1 h	4 h	8 h	24 h	48 h	96 h	168 h
Ecorce	0	nd	0	0	0.349±0.10	nd	0	0
Feuille	0	nd	0	0	0	nd	0	0

2.9. DOSAGE D'ETHYLENE

L'éthylène a été dosé par injection de 1 mL de gaz dans une chromatographie en phase gazeuse de HP 5280 muni d'un détecteur à ionisation de flamme (FID) et d'une colonne capillaire GS-Q (30m de longue, diamètre interne 0,32 mm, épaisseur 0,5 mm). Le débit de gaz vecteur est de 1,7 ml/min. La température de l'injecteur est de 200°C. La température du four est isotherme à 70°C et celle du détecteur est de 200°C avec les débits d'air et d'hydrogène de 280 et 32 ml/min respectivement. La calibration du chromatographe a été effectuée par injection de gaz standard contenant 100 ppm de C_2H_4 (Alltech, France). La surface des pics est intégrée à l'aide du logiciel Chrom-card pour Windows, version 1.17.

2.10. IMPACT DES TRAITEMENTS ETHREL ET BLESSURE SUR LA SENESCENCE

Pour les effets des traitements éthyléniques, on observe un effet très mineur sur les tiges et beaucoup plus important au niveau des feuilles. Les écorces sont légèrement décolorées dès 4 jours mais ce phénomène ne s'accentue pas. Les feuilles sont plus sensibles à l'éthéphon que l'éthylène gaz. Dès 4 jours après traitement, on visualise une dégradation de la chlorophylle dans les 2 cas mais plus importante avec l'éthéphon (Figure 11). A 7 jours, les feuilles traitées à l'éthéphon commencent à tomber. A ce même stade avec l'éthylène, les feuilles sont encore attachées mais le début de l'abscission foliaire est noté par détachement manuel très facile des feuilles.

Pour la blessure, on note des taches nécrotiques au niveau des zones blessées (scarification de l'écorce et écrasement des feuilles). Ces changements n'ont toutefois été observés que sur une brève période inférieure à 48 heures.

2.11. ANALYSE PAR SOUTHERN BLOT.

2.11.1. Extraction d'ADN

L'extraction d'ADN génomique s'effectue à partir d'un gramme de matériel végétal frais broyé dans l'azote liquide. La poudre congelée est mélangée à 5 mL de tampon d'extraction (2% (P/V) MATAB, 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl pH = 8, 1% PEG 6000, 0,5% sulfite de sodium) et chauffée à 74°C pendant 30 minutes. Après une extraction au chloroforme/isoamylalcool (1 volume), l'ADN est précipité avec 0,7 volume d'isopropanol et agité doucement. La pelote d'ADN formée lors du mélange est prélevée à l'aide d'une pipette Pasteur et reprise dans 300 µL de TE (10 mM Tris-HCl pH = 8,1 mM EDTA pH = 8) par agitation pendant 1 jour à température ambiante. L'ADN est ensuite conservé à 4°C.

2.11.2. Southern blot

L'ADN génomique extrait précédemment est digéré par les enzymes *KpnI*, *SacI*, *EcoRV*, *BamH*1, *Eco*RI et *Xba*I. Pour un mélange réactionnel de 300 µL comportant 10 µg d'ADN, 30 µL de tampon de l'enzyme et 30 unités d'enzyme sont incubés à 37°C pendant 4 heures. L'ADN de cette réaction est ensuite purifié par une première extraction au phénol/chloroforme/isoamylalcool, et une seconde au chloroforme/isoamylalcool. Les fragments d'ADN sont alors séparés sur un gel (1% d'agarose dans 1X TAE) puis transférés

sur une membrane de nitrocellulose (Hybond N+, Amersham) avec une solution de 0,4N NaOH.

Les membranes sont préhybridées à 65°C pendant 2 heures dans un mélange composé de 6X SSC, 50 mM de Tris-HCl pH = 8, 0,25 mM d'EDTA pH = 8,0.5 % SDS, 5X Denhart et 100 µg/mL de sperme de saumon fraîchement dénaturé. L'hybridation est effectuée dans le même tampon contenant 10 % de dextran sulphate et 25 ng d'un fragment PCR purifié (Wizard® PCR prep, Promega) marqué avec 40µCi [α ^{32}P]dCTP grâce au kit Megaprime^{TM} DNA labelling Systems (Amersham, biosciences). Après une hybridation d'une nuit à 65°C, les membranes sont lavées avec du 2X SSC et du 0,1 % SDS. Après une exposition d'environ sept jours à -80°C, les films sont révélés et analysés.

2.11.3. Amorces utilisées pour la préparation des sondes

HbACO-O48 (144 pb) : R : TGCA TCAC TTCC AGGG TTGT et S : GGAA GGTG ATGA AGGA GTTT G
HbACS-D10 (142 pb) : S-1772 : TATCATATGGGATTTTCTGT et R-1913: ATTAAAGTGCATCAACTATT

2.12. HISTO-CYTOLOGIE

2.12.1. Fixation

Les explants sont découpés et placés dans le fixateur pendant 24h, la 1ère h sous vide.

Déshydratation. Les explants sont ensuite déshydratés : le fixateur a été remplacé par un bain d'éthanol à 70% (1 h), 2 bains d'éthanol à 95% (15 et 30 min), et 1 bain d'éthanol absolu (15 min).
Imprégnation. Les échantillons subissent successivement 2 bains de butanol 100% (30 min et 2 h), et 1 bain de butanol 100% / résine tissus mous (V/V) pendant une nuit. Ce dernier bain a été remplacé par de la résine tissus mous pour 3 jours.
Inclusion. Les explants sont inclus dans un mélange résine tissus mous et de durcisseur. Après le montage des plots, des coupes de 4 µm d'épaisseur sont réalisées au microtome et étalées sur lames.
Double coloration. Dans un premier temps, les coupes sont hydrolysées à l'acide périodique pendant 5 min à température ambiante, puis lavées à l'eau courante et à l'eau distillée. Elles sont ensuite colorées par le réactif de Schiff (Sigma) à l'obscurité et à température ambiante pendant 10 min et lavées 2 min dans un bain d'eau sulfureuse. Les coupes sont lavées à l'eau courante, puis à l'eau distillée. Les polysaccharides sont ainsi colorés en rose. Les coupes sont ensuite colorées pendant 7 min dans le *naphthol blue-black* (Aldrich) filtré et préalablement porté à 50°C. Elles sont lavées rapidement à l'eau courante, puis la coloration a été régressée à l'acide acétique 1 ou 2 min sous contrôle microscopique. Les protéines sont colorées en bleu.
Montage. Enfin les coupes sont séchées et montées entre lames et lamelles dans une résine de montage (Micromount).

2.12.2. Caractérisation histologique des tiges à différents stades de développement

Afin de mieux comprendre l'évolution de la différenciation des cellules laticifères dans les tissus de l'écorce au cours du développement des plants d'hévéa, une synthèse des divers travaux a été réalisée.

2.12.2.1. Tiges de plants issus de germination

Pour décrire l'anatomie de la tige et son évolution, nous avons fait référence aux quatre stades phénologiques décrits par Hallé (Hallé & Martin, 1968). Une étude a été entreprise sur des germinations de graines GT1 « illégitimes » issues d'allo-fécondation naturelle étant donné que ce clone est mâle stérile (Vidal, 2003). Ces plantules ont été prélevées à partir du stade une feuille (correspondant à une unité de croissance ou *flush*) jusqu'au stade cinq feuilles (ou deux unités de croissance). Le **phloème** est peu différencié et est difficilement distinguable du parenchyme cortical. Dans la zone accolée au cambium côté phloème, on trouve des cellules très actives qui synthétisent des particules de caoutchouc dans leur cytoplasme. Les discrètes particules de polyisoprène sont le premier critère indubitable de reconnaissance des **cellules laticifères** (Hébant *et al.*, 1981). Ces cellules sont présentes dans ce tissu encore très jeune et forment des anastomoses par l'hydrolyse de leurs parois communes.

Le cambium libéro-ligneux produit des laticifères qui peuvent former des anastomoses avec ceux déjà présents. Cependant ce phénomène est anecdotique avant l'apparition périodique des laticifères secondaires (Hao & Wu, 2000). Ces cellules sont semblables aux autres cellules produites par le cambium libérien, mais elles produisent du caoutchouc et forment très tôt des anastomoses. En effet, on peut reconnaître ces cellules par leur forme, qui est celle de plusieurs cellules rassemblées (par deux ou trois) avec une paroi unique. En coupe transversale, on peut remarquer des restes de parois qui ont été digérées pour permettre la fusion des cellules (Vidal, 2003). Le symplasme forme un continuum cytoplasmique et permet la circulation des particules entre les cellules. En coupe longitudinale, on remarque que ces cellules laticifères forment un réseau sur toute la longueur de la coupe et de façon très précoce. Ce réseau est appelé articulé car il est composé de plusieurs cellules qui s'anastomosent. La taille et le nombre d'anastomoses des laticifères primaires augmentent peu au cours du temps. En fait, **le phloème secondaire (ou liber) se développe rapidement mais les laticifères secondaires n'apparaissent que relativement tard : après cinq unités de croissance** et dans la partie la plus âgée seulement. Ces cellules sont présentes très tôt lors de la formation de la tige et on peut également les trouver de façon anecdotique dans la moelle et le cortex. La distribution de ces laticifères primaires est donc initialement et en quasi totalité dans les tissus primaires du cortex.

2.12.2.2. Tiges de rejets de germination

La caractérisation d'un rejet comportant cinq unités de croissance 4 mois après recépage a été réalisé sur un plant du clone GT1 (Vidal, 2003). On retrouve la même anatomie que celle décrite pour les germinations, mais **on découvre des niveaux de différenciation non atteints dans les plants issus de germination étudiés**. Le diamètre initial est largement supérieur à celui du matériel issu de germination. Quant au liber, sa croissance est largement inférieure à celle du bois. Le liber se limite à quelques couches de tubes criblés et de laticifères.

2.13. HYBRIDATION *IN SITU*

2.13.1. Préparation des coupes histologiques

Toutes les étapes décrites ci-dessous sont réalisées dans des conditions sans RNase.

Fixation. Les différents tissus de plantules somatiques (racines, tiges, feuilles) et les écorces de rejets sont découpés et fixés dans une solution de PFA 4% dans PBS 1X durant une nuit 4°C (16 h maximum), la première heure sous vide. Le fixateur a été ensuite éliminé par une série de lavages : 2 bains de 15 min dans PBS 1X + glycine 0,1M puis 2 bains de 15 min dans du PBS 1X.

Déshydratation. Les explants sont déshydratés dans des bains à concentration croissante en éthanol (de 50 à 95%) puis dans du butanol 100%, 3 jours pour les plantules somatiques et 1 semaine pour les rejets.

Imprégnation. Les échantillons sont transférés dans les bains suivants pour l'imprégnation progressive en paraffine : 1h dans éthanol/safesolv (2/1), 1h dans éthanol/safesolv (1/1), 2 fois 1h dans du safesolv pur, 1h dans paraplast/safesolv (1/3), 1h dans paraplast/safesolv (1/1), 1h dans paraplast/safesolv (3/1), 2 fois 1h dans du safesolv pur puis une nuit pour les plantules somatiques et 3 jours pour les rejets dans de la paraffine pure sous agitation à 60°C (Histokinette).

Inclusion. Les explants sont disposés dans des moules remplis de paraffine. Les blocs obtenus sont conservés à –20°C. Les coupes sont réalisées au microtome avec une épaisseur de 10 µm et déposées sur des lames silanisées (DAKO, Carpinteria, USA).

L'évolution le long de la tige est quasiment inexistante pour le liber, sauf en ce qui concerne le nombre d'anastomoses qui augmente légèrement.

2.13.2. Synthèse des sondes ARN marquées à la DIG

Synthèse des matrices d'ADN. Des parties d'ADNc de gènes *HbACO-H4*, *HbACO-H5* et *HbACO-O4.8* sont utilisés pour générer des transcrits sens et antisens marqués à la DIG ou à la Biotine. Ces fragments matrices sont amplifiés par une première PCR avec des amorces spécifiques comprenant soit en 5' soit en 3'une extension correspondant à la séquence du promoteur T7 RNA polymérase. Le tube 1 contient des primer T7-Pup (sens) et Pdown (antisens) et permet de générer uniquement des sondes Sens. Le tube 2 contient des primer T7-Pdown et Pup et sert à générer des sondes antisens. Une deuxième PCR permet d'amplifier uniquement la population des fragments contenant le T7 complet en utilisant une amorce spécifique de l'extrémité T7. Les produits d'amplification issus de la PCR2 sont purifiés par précipitation dans 1/10 vol. d'acétate de sodium (3M) et 2,5 vol d'éthanol absolu.

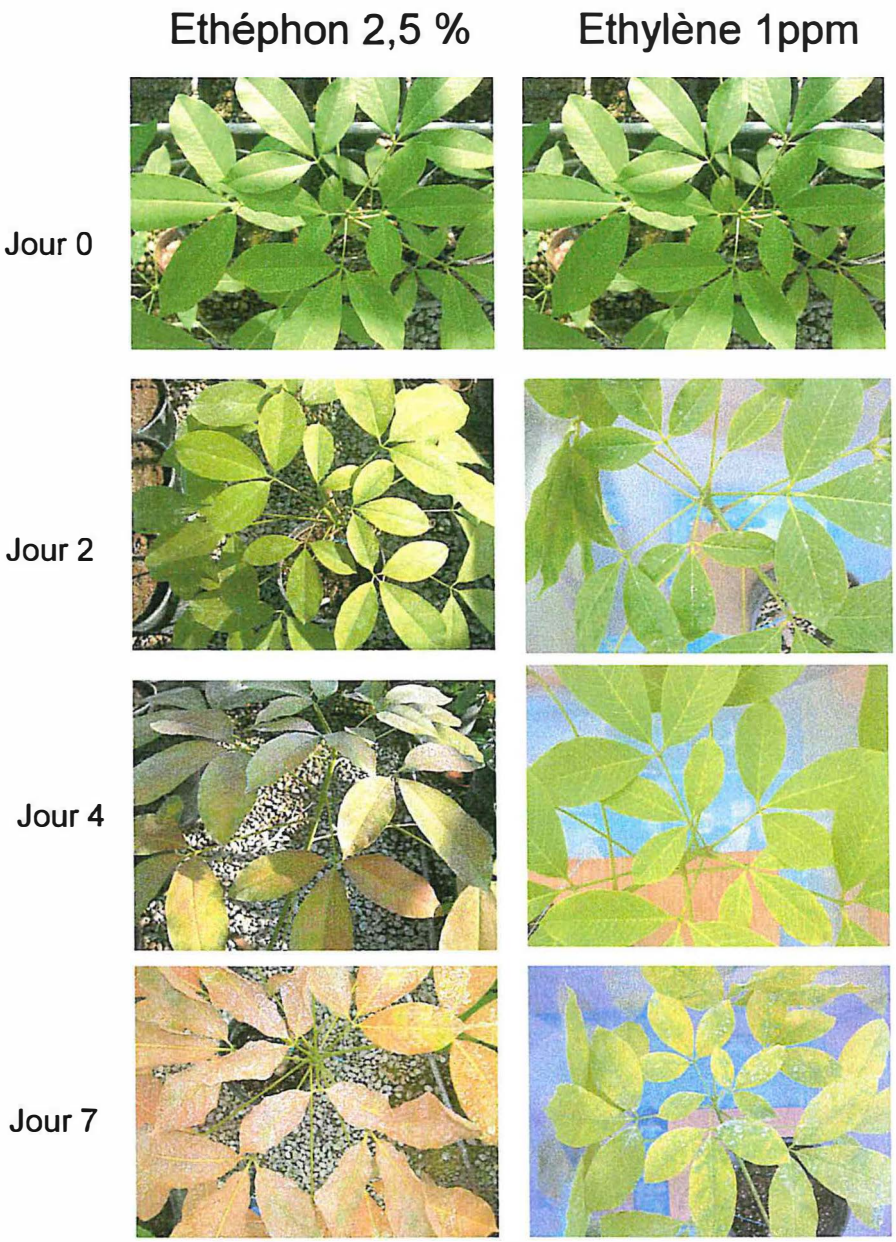

Figure 11 . Symptômes observés au cours de la stimulation éthylénique

Transcription *in vitro* et marquage à la digoxigénine (DIG). Cette étape a été réalisée avec le kit Maxi-Script (Ambion, Cambridgeshire, UK) à partir des matrices d'ADN purifiées. Le marquage des sondes à la DIG a été réalisé durant cette étape par l'utilisation de bases uraciles marquées à la DIG. Les transcrits obtenus sont purifiés par précipitation dans 1/10 vol d'acétate de sodium (3M) et 2,5 vol d'éthanol absolu. La vérification du marquage de la sonde se fait par *dot-blot*. Les sondes obtenues sont conservées à –20°C.

Marquage des sondes au psoralène-biotine. Le marquage a été réalisé avec le kit Ambion BrightStar (Ambion, Cambridgeshire, UK) et consiste à fixer le réactif psoralène-biotine sous lampe UV. La vérification du marquage de la sonde se fait par Dot-Blot. Les sondes obtenues sont conservées à –20°C.

2.13.3. Histo-hybridation

Préparation des coupes. Les coupes sont déparaffinées par 2 bains de 10 min du Safesolv (Labonord, Templemars, France) puis réhydratées par une succession de bains d'éthanol : 3 fois 10 min dans l'éthanol absolu, 2 min dans l'éthanol 70% et 2 min dans l'éthanol 50% puis 2 fois 2 min dans de l'eau-DEPC.

Traitement à la protéinase K. Une déprotéinisation enzymatique a été effectuée à 37°C pendant 30 min avec une solution de protéinase K à 0,1U final. Cette réaction a été stoppée par 2 bains de 5 min dans le tampon d'arrêt de la protéinase K. Les lames sont rincées 2 min dans une solution PBS 1X + 0,2% de glycine et lavées 2 fois 2min dans du PBS 1X. Elles sont ensuite déshydratées par une succession de bains d'éthanol : 1 min dans l'éthanol 50%, 1min dans l'éthanol 70% et 2 fois 1 min dans l'éthanol absolu.

Pré-hybridation. Une pré-incubation a été effectuée dans le milieu d'hybridation sans sondes pendant 2h à 45°C.

Hybridation. Des chambres d'hybridation sont collées sur les lames et remplies avec 100µL de mix d'hybridation contenant : 50µL de formamide déionisé 100%, 10µL de SSC 20X, 20µL de sulfate de Dextran 50%, 1µL de Denhardt 100X, 1µL d'ARNt à 100mg/l, 200ng de sonde ARN marquée à la DIG et de l'eau-DEPC qsp 100µL. Les ARNt et les sondes ARN sont préalablement dénaturés 5min à 70°C. L'hybridation se fait à 45°C durant une nuit dans une atmosphère saturée en eau.
Lavages. Le lendemain, les lames subissent des lavages de post-hybridation. On choisit un lavage peu stringent : 3 fois SSC 2X 15min à 55°C, 2 fois NTE 1X à 37°C 5min, solution RNase A à 20µg/mL dans du NTE 1X à 37°C pendant 30min, 2 fois NTE1X à 37°C 5min, 2 fois SSC 2X 15min à 55°C, PBS 1X pendant 10min à 30°C.

Révélation au NBT-BCIP. Les coupes sont traitées avec une solution de blocage « Blocking reagent » (ROCHE, Wilmington, USA) à 1% dans du PBS à 30°C pendant 1h. Un anticorps anti-digoxigénine couplé à une phosphatase alcaline et dilué 500 fois dans une solution de blocage 1% (ROCHE, Wilmington, USA) a été déposé sur les coupes 1h à 30°C. Les lames sont rincées 3 fois 10 min dans du PBS 1X à 30°C puis équilibrées 2 fois 10 min à 30°C dans du tampon de révélation de la phosphatase alcaline pH 10,5. Enfin, la solution de révélation NBT-BCIP (Chemicon International, USA et Europe) a été déposée sur les lames et laissée à 20°C à l'obscurité jusqu'à apparition du signal.

Incorporation de fluorochromes Alexa488. Les coupes sont traitées avec une solution de blocage « Blocking reagent » (ROCHE, Wilmington, USA) à 1% dans du PBS 1X à 30°C pendant 1h. Un anticorps anti-digoxigénine (monoclonal de souris) a été dilué 200 fois dans une solution de blocage 1% (ROCHE, Wilmington, USA) puis déposé sur les coupes 1h à 37°C. Les lames sont rincées 3 fois 10 min dans du PBS 1X à 30°C. Un anticorps anti-souris à 0,5mg/mL (fait sur Lapin) couplé à des fluorochromes Alexa488 a été dilué 50 fois dans une solution de blocage 1% (ROCHE, Wilmington, USA) puis déposé sur les coupes 1h à 30°C à l'obscurité. Les lames sont rincées 3 fois 5min avec 1mL de PBS 1X à 30°C à l'obscurité. Un anticorps de chèvre contre les protéines de lapin (0,5mg/mL) couplé à des fluorochromes Alexa488 a été dilué 50 fois dans une solution de blocage 1% (ROCHE, Wilmington, USA) puis déposé sur les coupes 1 h à 30°C à l'obscurité. Les lames sont rincées 3 fois 5 min avec 1 mL de PBS 1X à 30°C puis 5 min dans de l'eau stérile à l'obscurité.

3. ISOLEMENT ET CARACTERISATION DES GENES CODANT L'ACC SYNTHASE

3.1. ISOLEMENT DES SEQUENCES PARTIELLES

Etant donné d'une part que les membres de la famille multigénique *ACS* ont une régulation spatio-temporelle, et d'autre part, l'intérêt porté sur la caractérisation de l'expression de ces gènes chez l'hévéa à plusieurs niveaux de la plante (cal, écorce, etc.), l'isolement par PCR de fragments partiels de ces gènes a été réalisée à partir de différents matériels : feuilles, cals, écorces de jeunes plants d'hévéa soumis ou pas à une stimulation de 24 heures à l'Ethrel™, et à partir de deux banques phagiques d'ADNc de méristèmes et d'écorces d'hévéa.

Les amorces dégénérées ont été définies à partir des régions conservées de gènes codant l'ACC synthase (§ Matériel et Méthodes, Tableau 4). Pour cela, un alignement des séquences protéiques d'une centaine d'espèces végétales a été réalisé à partir des séquences disponibles sur la base de données SWISSPROT.

Des produits PCR ont pu être obtenus à partir de différentes matrices issues de cal, d'écorce et de feuille avec des tailles allant de 300 à 1000 pb. Les 42 produits PCR ont été clonés dans un vecteur pGem-T-Easy puis séquencés à partir de l'amorce T7.

Une première comparaison de séquences avec la base de données NCBI utilisant les logiciels BlastX et BlastN a permis de constater que tous les produits clonés présentaient de fortes conservations de séquence (>80%) avec des séquences ACS connues (Tableau 11). Les clones séquencés ont ensuite été alignés ensemble avec le logiciel ClustalW. L'analyse de la redondance parmi les 42 clones a permis d'en identifier 16 différents pour leur séquence ou leur longueur. Enfin, l'analyse précise de ces clones a conduit à conserver les 5 clones les plus longs et représentatifs de la diversité des séquences *ACS* : F10, E4, D10, F2 et F3 (Tableau 12). Ainsi, les fragments *HbACS* clonés correspondraient aux ACS1 et ACS2 des espèces pour lesquelles on obtient les degrés d'homologie les plus forts : *Populus euphratica*, *Populus euramericana* et *C. sinensis*.

Des amorces spécifiques ont été définies à partir des séquences partielles afin de pouvoir amplifier les gènes correspondants (Tableau 5).

3.2. ISOLEMENT DES CLONES PLEINES LONGUEURS

3.2.1. Criblage de banques phagiques d'ADNc

Deux banques phagiques d'ADNc préparées à partir d'ARN extraits d'écorce et de méristèmes caulinaires d'hévéa sont disponibles au laboratoire. La banque « méristème » a été étalée afin d'obtenir 500.000 pfu sur 3 boîtes carrées. Les plages de lyse ont été transférées sur des membranes. Après fixation de l'ADN, ces dernières ont été hybridées avec un mélange de sondes *ACS* (F10, E4, D10, F2 et F3). Les amorces spécifiques ont été utilisées afin de pouvoir amplifier les gènes correspondants dans les différents isolats de plages de lyse. Finalement aucun clone *ACS* n'a pu être isolé par cette stratégie.

Tableau 11. Analyse BlastN de groupe de séquences ACS d'hévéa.

Groupes	Espèces	Gènes	Types	Longueurs (pb)	e-value	Identité (%)	Régions homologues
1. D8, D9, B8, B7, D11	Populus euphratica	Peacs1	Complet cds	1864	e-173	83	15-910
	Carica papaya	Acs1	Partiel cds	1194	7e-74	81	1-559
					6e-22	84	765-916
	Citrus sinensis	Acs mRNA	Partiel cds	1734	5e-78	80	39-669
					1e-13	80	738-923
					9e-24	80	720-914
2. D10	P. euphratica	Peacs1	Complet cds	1864	e-134	83	23-807
	P. tremula x P. Tremuloides	Acs1	Partiel cds	1098	e-117	81	23-807
	C. sinensis	Acs2-gene	Partiel cds	2564	2e-46	81	32-413
					6e-13	84	482-591
3. E10,E5, E12, F1, E11	P. euphratica	Peacs1	Complet	1864	2e-40	83	28-301
	P. tremula x P. Tremuloides	Acs	Partiel	1098	8e-40	82	28-301
	Mangifera indica	Acs mRNA	Partiel	1096	1e-26	87	174-301
4. B11	P. tremula x P. Tremuloides	Acs1 mRNA	Partiel cds	1098	e-173	84	22-851
	P. euphratica	Peacs1	Complet cds	1864	e-172	84	25-887
	C. sinensis	Acs mRNA	Partiel cds	1734	8e98	80	50-852
5. D12	P. tremula x P. Tremuloides	Acs1 mRNA	Partiel cds	1098	e-176	84	7-842
	P. euphratica	Peacs1	Complet cds	1864	e-167	84	7-842
	C. sinensis	Acs mRNA	Partiel cds	1734	5e-93	81	50-780
6. E6, E7, E8, E9, E1, E3, E2	Nicotiana tabacum	Acs4-gene	Partiel	3234	4e-20	89	180-268
	Cucumis melo	Cme-acs3 mRNA	Partiel	1113	2e-19	85	180-307
	Cucumis sativus	CS-acs3 mRNA	Complet	1820	2e-19	85	180-307
7. B12, D6	Fagus sylvatica	Acs1.1 gene	Partiel	941	6^{e}-22	82	117-296
	P. tremula x P. Tremuloides	Acs1 mRNA	Partiel	1098	4^{e}-20	89	2-174
	C. papaya	Paccs gene	Partiel	1394	2^{e}-15	86	83-181
8. F10, F11	P. euphratica	Acs	Complet	1864	4e-21	80	94-356
	Mangifera indica	Acs	Partiel	1096	1e-18	83	49-203
	Averrhoa carambola	Acs	partiel	1107	6e-17	88	67-158
9. C7, F5, C6, C8	P. euramericana	Peacs-2 mRNA	Complet	1868	5^{e}-42	81	28-401
	P. tremula x P. Tremuloides	Acs-2 mRNA	Partiel	1094	6^{e}-26	79	28-354
	Mangifera indica	Acs	Partiel	1096	3^{e}-15	81	25-205
10. F4, F6, F7, F9	P. euramericana	Peacs2 mRNA	Complet	1868	8e-25	80	70-334
	C. sinensis	Acs2 mRNA	Complet	1809	3e-12	80	165-340
	Brassica oleracea	Acs3 mRNA	Partiel	1109	2e-07	88	304-363
11. F3	P. euramericana	Peacs2 mRNA	Complet	1868	2e-54	81	204-622
	C. sinensis	Acs2 mRNA	-	1809	4e-22	80	240-400
	Mangifera indica	Acs mRNA	Partiel	1096	5e-12	81	453-628
					2e-29		178-426
12. C10	Glycine max	Acs mRNA	-	1789	8e-06	86	199-259
	P. euramericana	Peacs-2 mRNA	Complet	1868	8e-06	82	55-147
	Betula pendula	Acs-2 mRNA	Partiel	1101	0.002	82	196-276
					1.8	92	122-149
13. C11	P. euramericana	Peacs2 mRNA	Complet	1868	2e-29	81	28-300
					0.046	87	382-428
	P. tremula x P. Tremuloides	Acs2 mRNA	Partiel	1094	2e-13	79	28-269
	C. sinensis	Acs2 mRNA	-	1809	1e-11	81	25-179
					0.046	79	232-354
					2.8	95	378-401
14. C9	P. euramericana	Peacs2 mRNA	Complet	1868	2e-29	81	1-273
					0.043	87	355-401
	P. tremula x P. Tremuloides	Acs2 mRNA	Partiel	1094	2e-13	79	1-242
	C. sinensis	Acs2 mRNA	-	1809	5e-11	86	67-152
					0.043	79	205-327
					2.7	95	351-374
16. C12, D2, D4, D5	Prunus persica	Acs1 mRNA	Partiel	1100	9e-11	88	132-200
	Solanum melongena	Acs gene	Partiel	1123	1e-09	89	1-59
					8e-05	85	138-204
	Polargonum hortorum	PG AC-2 acs mRNA	Partiel	1170	2e-08	83	108-200
					5.0	87	10-48
20. E4	P. euramericana	Peacs2 mRNA	Complet	1868	9^{e}-30	82	10-250
	P. tremula x P. Tremuloides	Acs2 mRNA	Partiel	1094	6^{e}-25	86	10-250
					4^{e}-04	84	180-250
	Mangifera indica	acs	Partiel	1096	8^{e}-21	83	7-169
21. F2	P. euramericana	Peacs2 mRNA	Complet	1868	8e-38	80	38-432
	P. tremula x P. Tremuloides	Acs2 mRNA	Partiel	1094	2e-23	79	85-435
	Mangifera indica	acs	Partiel	1096	2e-20	81	234-435

Tableau 12. Détails des cinq clones *ACS* sélectionnés comme représentant la variabilité des populations des clones. Résultat issu de l'alignement de toutes les séquences clonées avec ClustalW.

Matrice initiale			PCR1		PCR2		Tailles produits	Noms séquences sélectionnées	Homologie	Régions homologues	Gènes homologues
Tissus	Ethrel (%)	Acide nucléique	Sens	antisens	sens	antisens	(pb)		(%)		
Cal	0	ADNc sb	Ole2	Ole4	-	-	400	F10	80% (4e-21)	94-356	Acs (P. euphratica)
Cal	0	ADNc sb	Ole5	Ole6	Acs1F	Acs1R	300	E4	82% (9^{e}-30)	10-250	Acs2 (P. euramericana)
Feuille	0	ADNc sb	Ole5	Ole4	-	-	1000	D10	83% (e-134)	23-807	Acs1 (P. euphratica)
Feuille	0	ADNc sb	Ole5	Ole4	Acs1F	Acs3R	400	F2	80% (8e-38)	38-432	Acs2 (P. euramericana)
Feuille	0	ADNc sb	Ole5	Ole4	Acs1F	Acs3R	400	F3	81% (2e-54)	204-622	Acs2 (P. euramericana)

3.2.2. Extension des extrémités 5' et 3' des séquences partielles d'ADNc par RACE-PCR

Les séquences de plusieurs amorces ont été définies (Tableau 6), selon les consignes du kit *BD SMART™ RACE cDNA amplification* (BD Biosciences, San Rose, CA, USA). Les produits PCR obtenus à partir d'ADNc simples brins ont été clonés et séquencés. Après vérification par comparaison de séquences avec les logiciels BlastN et BlastX sur le site NCBI, les extrémités 3' des ADNc correspondant aux clones D10, F3 et F10 ont été retenues, et seulement l'extrémité 5' pour le clone D10. Les séquences des amorces ont ainsi pu être définies aux extrémités potentielles des clones cités et un ADNc pleine longueur a pu être amplifié et isolé pour *HbACS-D10*. Sa séquence est de 1932 pb avec une phase ouverte de lecture (ORF) de 1440 pb codant 480 acides aminés.

3.2.3. Isolement et caractérisation d'un fragment génomique pour D10

Le couple d'amorces défini aux extrémités 5' et 3' de l'ADNc *HbACS-D10* a été utilisé pour une amplification de la séquence génomique à partir d'extrait d'ADN génomique. La séquence du produit d'amplification fait 2928 pb. L'analyse de cette séquence sur la base de données NCBI a permis de confirmer qu'il s'agissait d'un gène fortement similaire aux gènes *ACS* connus.

3.3. ANALYSE *IN SILICO* DES SEQUENCES ISOLEES

3.3.1. Structure du gène *HbACS-D10*

L'analyse de la séquence génomique du gène *HbACS-D10* a été effectuée (Figure 12). Elle comprend 3 introns et 4 exons avec des sites d'épissage GT/AG bien conservés par rapport aux autres espèces. Sa structure est similaire à celle de *LeACS3* et plus éloignée de celles de *LeACS4* ou *LeACS7* qui comportent seulement 2 introns, en l'absence du premier intron. En effet, l'exon 1 de ces deux derniers gènes sont deux fois plus longs que celui de *LeACS3* (Olson *et al.*, 1995).

La structure de la séquence nucléique totale de 2928 pb comprend :
- 3 introns,
- 4 exons constituant une ORF de 1440 pb,
- 86 pb en amont de la séquence codante (5'UTR),
- 429 pb en aval de la séquence codante (3'UTR).

La séquence nucléotidique porte une phase ouverte de lecture dont la traduction a permis une analyse de comparaison de séquences avec celles d'autres espèces. La séquence polypeptidique déduite révèle des régions conservées ainsi que la présence de résidus acides aminés critiques pour la fonction de l'enzyme. Ces informations nous permettent de suggérer que le gène *HbACS-D10* code une ACC synthase active.

L'analyse des régions conservées de l'ORF montre qu'elle contient :
- 7 boîtes conservées,

- 11 résidus invariants conservés chez plusieurs aminotransférases et importants pour l'activité dépendante du PLP de ce groupe d'enzymes,
- 1 résidu sérine, site potentiel de phosphorylation par des enzymes de type kinase.

La longueur des exons et des introns a été comparée à celles des gènes *ACS* de plusieurs espèces (Tableau 13). La structure du gène *HbACS-D10* est comparable à celle de *LeACS3* où l'on retrouve 4 exons et 3 introns.

Tableau 13. Comparaison du nombre et des longueurs des exons et des introns de *HbACS-D10* avec ceux d'autres espèces.

Gènes	Longueurs peptides (aa)	Longueurs de chaque exon (pb)				Longueurs de chaque intron (pb)			
		1	2	3	4	1	2	3	4
HbACS-D10	480	55	44	53	329	142	82	467	-
LeACS3	469	49	44	54	322	115	113	92	-
LeACS4	476	106	54	316	-	507	732	-	-
LeACR7	467	93	54	320	-	103	96	-	-
MaACS5	439	56	45	51	287	90	88	80	-
OsACS1	487	59	46	54	328	95	99	98	-

3.3.2. Trois membres potentiels de la famille multigénique codant les ACS chez *H. brasiliensis*

Une évaluation du nombre de gènes codant pour les différentes isoformes d'ACS chez l'hévéa a été réalisée par hybridation moléculaire de type *Southern* avec une sonde *ACS-D10*. Cette analyse réalisée sur de l'ADN génomique des trois clones différents (PB 260, PB 217 et RRIM 600) démontre que le génome de l'hévéa porte probablement au moins 3 membres pour la famille multigénique codant les ACC synthase car trois bandes peuvent être observées au maximum pour les restrictions avec *Eco*RI (Figure 13). La différence entre les niveaux d'hybridation en termes d'intensité et de taille des bandes entre les clones révèlent un certain niveau de diversité dans les séquences et peut-être aussi dans le nombre de gènes. La sonde *ACS-D10* n'étant pas parfaitement identique à toutes les séquences isolées, on ne peut pas exclure que certains membres de la famille *ACS* n'aient pas hybridé et que le nombre de gènes *ACS* soit supérieur à 3.

L'analyse des séquences nucléiques traduites des régions 3' terminales des 3 clones *ACS* (D10, F3 et F10) montre qu'ils pourraient constituer différents membres de cette famille multigénique codant les ACC synthase chez *H. brasiliensis* (.Figure 14) Ces régions ont une identité entre-elles qui varie entre 63 et 88% (*HbACS-D10* vs *HbACS-F2* : 63% ; *HbACS-D10* vs *HbACS-F10* : 88% ; *HbACS-F2* vs *HbACS-F10* : 64%).

L'élargissement de l'analyse de ces séquences traduites pour le gène *HbACS-D10* et les deux autres membres F3 et F10, pour lesquels on ne dispose que des fragments partiels étendus en

3', comparées à celles des autres espèces répertoriées, montre des identités partagées allant de 69% et 79% (Tableau 14).

On peut donc en conclure à une variabilité de la séquence traduite des ACS qui conforte l'hypothèse que nous avons bien plusieurs membres d'une même famille multigénique.

3.3.3. Analyse phylogénique des séquences *ACS*

Parmi les espèces pour lesquelles on dispose de plusieurs membres de la famille multigénique codant l'ACC synthase, *L. esculentum* et *A. thaliana* ont le plus grand nombre de séquences (cf. analyse de la base de données SWISSPROT, mars 2006). Depuis 1998, on compte 8 membres *ACS* chez la tomate (Shiu *et al.*, 1998), tandis que l'on en compte 13 chez l'arabette, ACS1 étant inactif et *ACS3* étant un pseudogène, 11 gènes seulement sont fonctionnels (Yamagami *et al.*, 2003).

Disposant pour ces deux espèces de différents membres de la famille multigénique des *ACS*, ces séquences traduites ont été comparées à celle de HbACS-D10 pour identifier des gènes orthologues potentiels. D'une manière intéressante, HbACS-D10 est très proche du groupe LeACS6, LeACS1A et LeACS1B (Figure 15), et du groupe AtACS6, AtACS1 et AtACS2 (Figure 16). Ces observations sur les similitudes de séquence de HbACS-D10 pourrait faciliter l'identification de leur rôle *in planta*, s'il existe une conservation structure/fonction entre les différentes espèces.

Etant donné que HbACS présente un résidu sérine conservé comme AtACS2 et AtACS6, on pourrait considérer que cette enzyme soit régulée selon le processus de phosphorylation décrit par Chae et Kieber (Chae & Kieber, 2005). Toutefois, en utilisant la classification de Yoshida and coll. (Yoshida *et al.*, 2005), on peut répartir les gènes *HbACS* dans le premier groupe des isoenzymes à longue queue C-terminale après le domaine RLSF comprenant *AtACS2*, *AtACS6*, LeACS2 et *LeACS6*.

3.3.4. Structure des ACC synthases et identification des acides aminés critiques pour la fonction enzymatique

Malgré le polymorphisme de la famille multigénique ACS, la structure primaire de ces isoenzymes révèle une longueur des polypeptides allant de 441 à 496 acides aminés, et des régions fortement conservées (Wong *et al.*, 1999).

Une des caractéristiques nécessaires au polypeptide pour son rattachement à la famille des ACS est le site de liaison PLP (région 5) : Ser- Leu- Ser- Lys,- Asp- Leu/Met- Gly- Leu- Pro- Gly- Phe- Arg. Le rôle critique de certains résidus d'acides aminés pour l'activité de l'enzyme ACC synthase a été élucidé par mutagenèse directe ou aléatoire chez le pommier et la tomate (Capitani *et al.*, 1999 ; Huai *et al.*, 2001 ; Li *et al.*, 1997; McCarthy *et al.*, 2001; Tarun *et al.*, 1998 ; White *et al.*, 1994; Zhou *et al.*, 1999).

Tableau 14. Comparaison des séquences peptidiques codées par le gène *HbACS-D10* avec celles des autres espèces.

ACS	Espèces	Longueurs peptides (nb acides aminés)	Identité (région analysée) (%)	Exp value	Gaps (%)
HbACS-D10 pleine longueur	P. euphratica	(481aa)	79(367/462)	0	0(0/462)
	C. papaya	(487aa)	79(368/463)	0	0(3/463)
	C. sinensis	(483aa)	75(367/484)	0	1(5/484)
	P. hortorum	(489aa)	77(356/458)	0	1(5/458)
	M. domestica	(487aa)	77(361/465)	0	0(4/465)
	P. communis,	ACS5-487aa	75(352/465)	0	0(4/465)
	N. attenuata,	ACS3a-484aa	74(350/468)	0	1(7/468)
	L. esculentum,	Le-ACS1B-483aa	74(350/472)	0	0(3/472)
HbACS-F3 partiel	P. euramericana	(486aa)	76(187/245)	8e-104	2(7/245)
	C. sinensis -	(477aa)	76(182/239)	6e-102	1(3/239)
	S. hermonthica		71(173/242)	1e-97	1(3/242)
	D. kaki		71(173/243)	2e-96	0(1/243)
	P. pyrifolia	(495aa)	72(179/248)	5e-96	2(6/248)
	P. persica	(492aa)	72(174/241)	1e-95	2(5/241)
	P. communis,	ACS4 (495aa)	71(177/248)	5^{e}-95	2(6/248)
	P. mume	(492aa)	70(170/241)	3e-93	2(5/241)
	M. domestica	(487aa)	69(168/243)	6e-93	1(3/243)
	P. hybrida		69(173/248)	8e-93	2(7/248)
HbACS-F10 partiel	C. papaya	(487aa)	77(166/214)	3e-88	3(8/214)
	P. euphratica		74(156/209)	6e-83	0(0/209)
	G. max	(484 aa)	69(143/207)	2e-80	0(1/207)
	C. sinensis	(483aa)	73(154/209)	7e-80	1(3/209)
	M. domestica	(487aa)	71(152/213)	2e-79	3(7/213)
	V. radiata	(484aa)	67(141/209)	4e-79	0(1/209)
	P. hortorum	(489aa)	72(154/212)	6e-79	2(2/212)
	G.hirsutum	ACS6 (444 aa)	72(154/212)	1e-77	3(7/212)

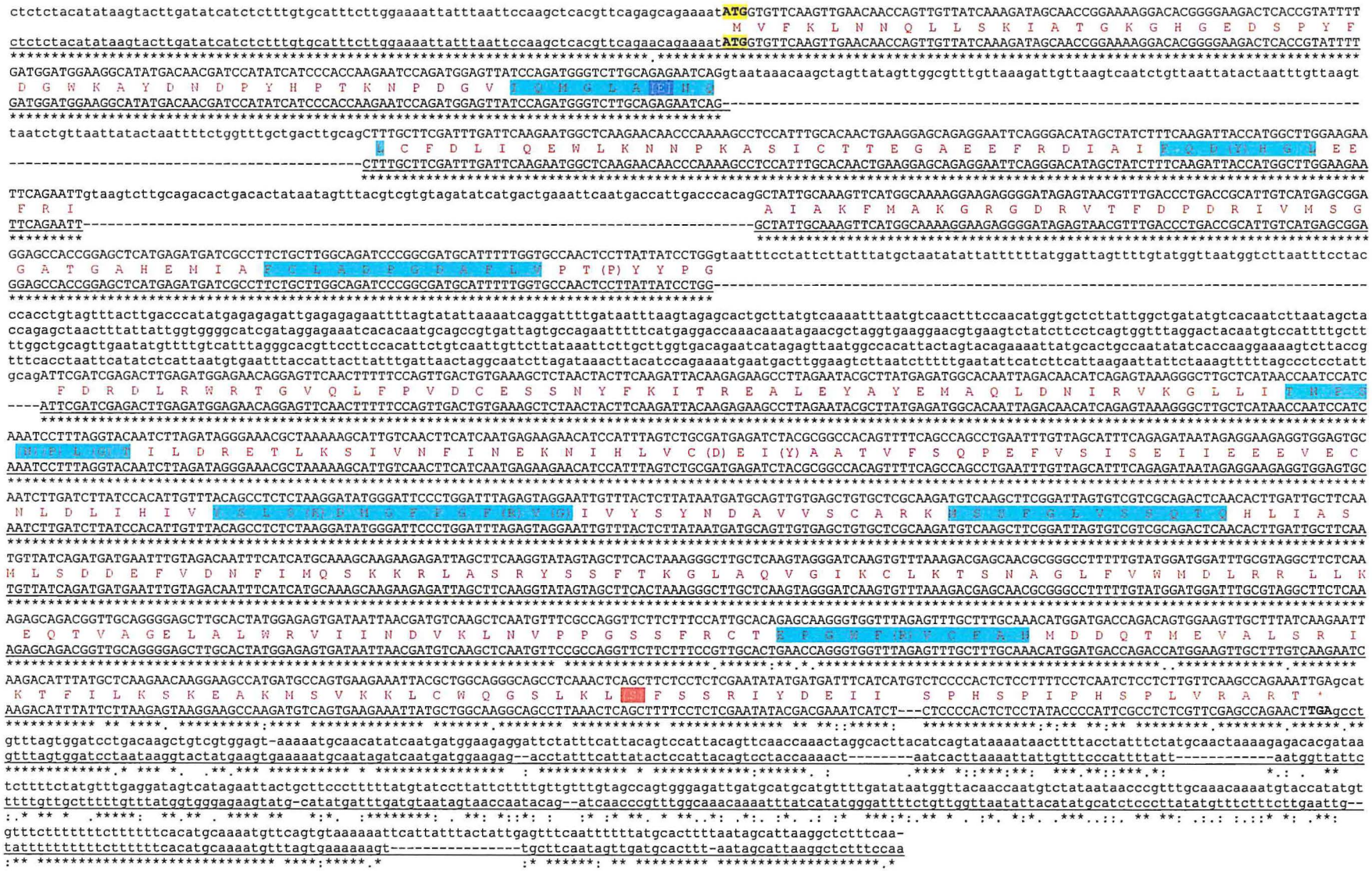

Figure 12. Structure de la séquence génomique de *HbACS-D10* et de la protéine codée par ce gène. La séquence ADNc est souligné. La traduction de la phase ouverte de lecture est en lettres rouges. Les parties non codantes (5'-UTR, introns et 3'-UTR) sont en lettres minuscules. Les exons sont en majuscules. Les boîtes conservées dans la famille ACS sont en bleu, les 11 résidues conservés dans la famille des aminotranférase sont entre {}, et le site éventuel pour la phosphorylation est en rouge. Le site d'initiation de la traduction est en jaune, et le codon stop est marquée d'une *.

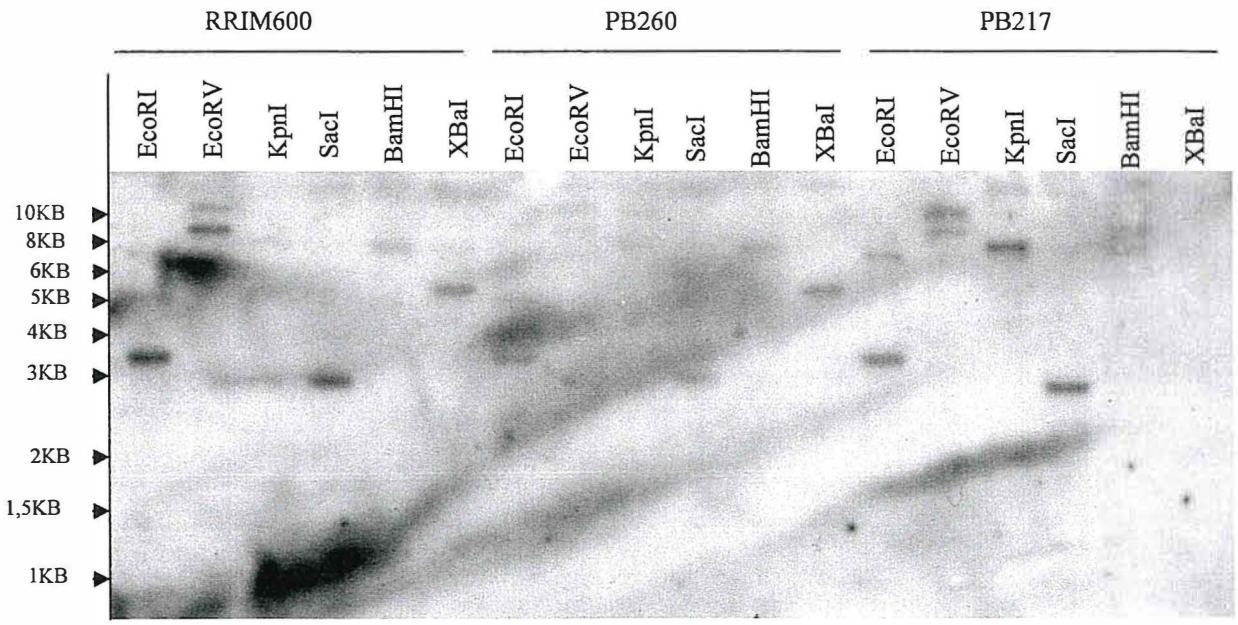

Figure 13. Hybridation moléculaire de type *Southern* d'une sonde dérivée de la partie codante du gène *HbACS-D10* sur de l'ADN génomique de 3 clones d'*H. brasiliensis* (RRIM 600, PB 260, PB 217). Pour chacun des clones, 8 µg d'ADN génomique ont été clivés par différentes enzymes de restriction (*Eco*R1, *Eco*RV, *Kpn*1, *Sac*1, *Bam*H1, *Xba*1).

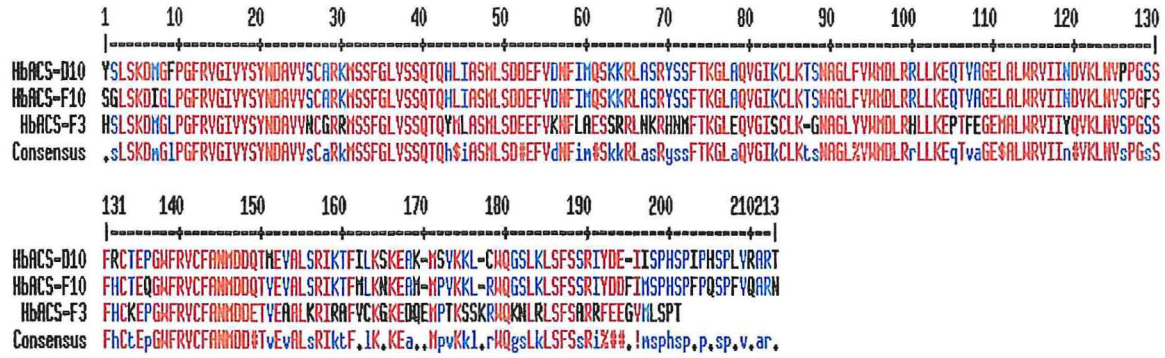

Figure 14. Comparaison des régions 3' terminales codées par les 3 ADNc *HbACS* isolés (D10, F3, F10). Les résidues conservées sont en rouge et les résidues différents sont en bleu ou noir.

La substitution de la Tyr par une Ala en position 85 conduit à l'inactivation de l'ACC synthase. Ainsi, la comparaison de la séquence peptidique HbACS-D10 à celles de LeACS2 et MdACS (Figure 17 ; Tableau 15), permet de noter que tous les résidus critiques pour la fonction de l'ACC synthase d'hévéa sont présents (Tableau 2). Cela nous permet de prédire que HbACS-D10 pourrait coder une ACC synthase fonctionnelle (Jakubowicz, 2002).

3.4. REGULATION DE L'EXPRESSION DU GENE *HBACS-D10* CODANT UNE ACC SYNTHASE

3.4.1. Effet de la stimulation par l'éthylène

L'accumulation des transcrits du gène *ACS-D10* est plus forte et plus rapide dans les feuilles que dans l'écorce. Le suivi en cinétique de l'expression du gène *HbACS-D10* dans des feuilles et des écorces de jeunes plants greffés montre une réponse transitoire à l'application de 1 ppm d'éthylène (Figure 18). Dans les feuilles, l'augmentation de la quantité de transcrits de *HbACS-D10* est observée dès une heure de traitement pour atteindre un maximum à 4 h. Un deuxième pic d'expression plus petit est enregistré à 96 h soit à 4 jours de traitement. Dans l'écorce, on observe les mêmes tendances dans le profil d'expression mais de façon moins contrastée et le premier pic est constaté à 8 h au lieu de 4 h.

3.4.2. Effet d'un inhibiteur de l'action de l'éthylène

L'éthylène est bien responsable de l'induction observée de l'expression du gène *HbACS-D10* après traitement éthylénique (Figure 19). En effet, l'utilisation du 1-MCP, un bloquant des récepteurs éthyléniques, pendant 16 h avant le traitement éthylénique permet de démontrer l'effet spécifique de l'éthylène sur l'expression du gène *HbACS-D10*. L'expression du gène *HbACS-D10* étant fortement activée à 8h, le traitement au 1-MCP a été poursuivi par 8h de stimulation éthylénique. Les concentrations de 1 ou de 5 ppm de 1-MCP abolissent l'effet de l'éthylène à la fois dans les feuilles et dans les écorces.

3.4.3. Effet de la blessure

Les ARNm du gène *HbACS-D10* s'accumulent rapidement et transitoirement par la blessure à la fois dans les feuilles et les écorces (Figure 20). Cette augmentation au niveau de l'écorce est très forte atteignant 8 fois le niveau de celle obtenue dans les feuilles après 1 h de traitement. Il est à noter la précocité de l'induction, dès 15 minutes, par rapport à celle enregistrée sous stimulation éthylénique.

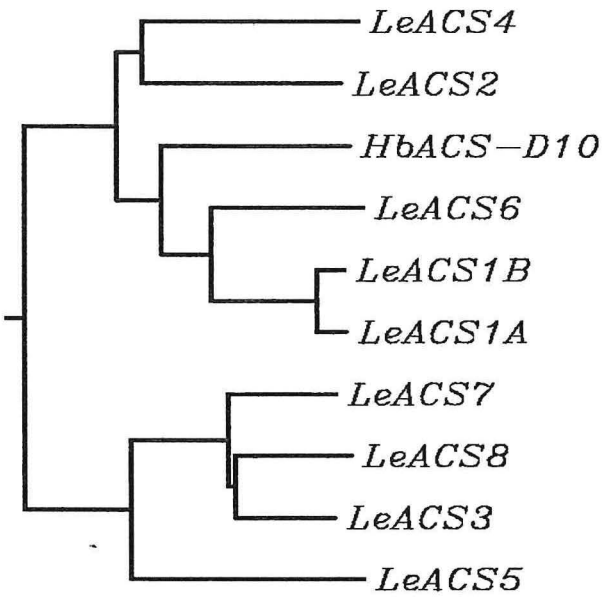

Figure 15. Dendrogramme illustrant la conservation des séquences protéiques entre HbACS-D10 et les proteines codées par la famille multigénique *ACS* chez *L. esculent*

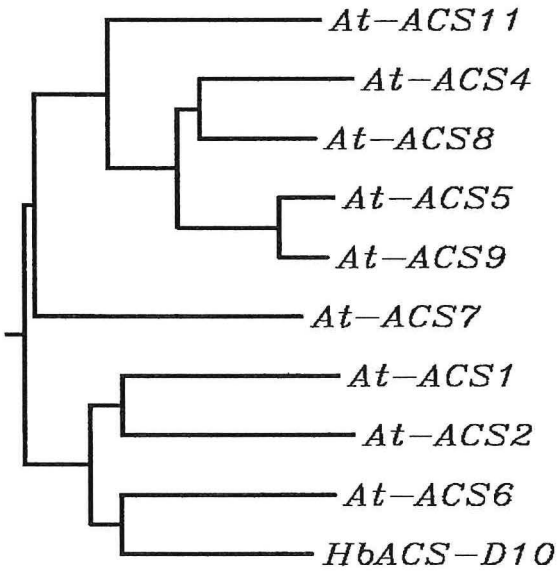

Figure 16. Dendrogramme illustrant la conservation des séquences protéiques entre HbACS-D10 et les protéines codées par la famille multigenique *ACS* chez *Arabidopsis thaliana*

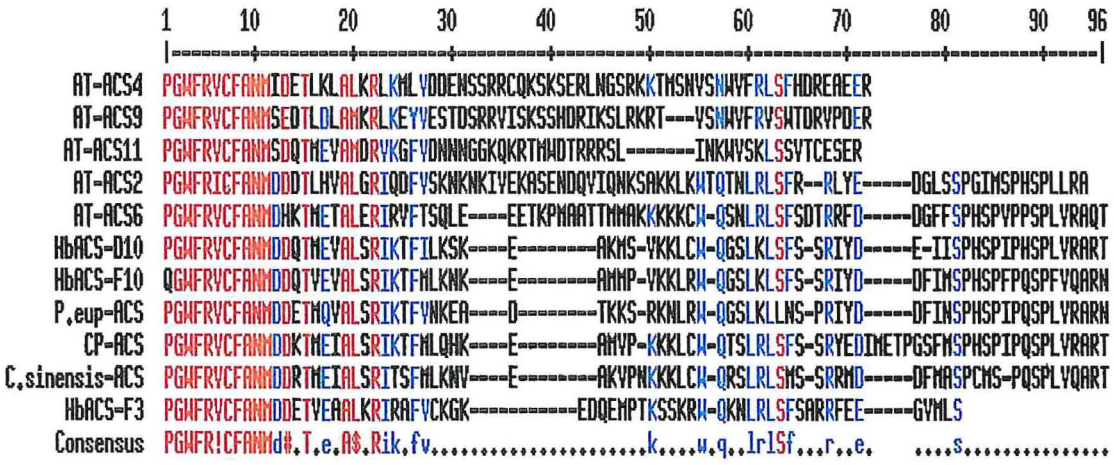

Figure 17. Comparaison des régions C-terminales des séquences protéiques codées par les gènes *HbACS* avec celles d'autres espèces. Les résidues conservées sont en rouge et les résidues différents sont en bleu ou noir.

Tableau 15. Position des acides amines conservés susceptibles d'être essentiels pour l'activité catalytique des ACC synthases chez *L. esculentum*, *M. domestica*, et *H. brasiliensis*.

Séquences	Résidus d'acide aminé / Position de ces acides aminés essentiels pour la catalyse et la structure des ACC synthase chez																						
	L	S	P	Y	F	A	E	Y	A	T	Y	P	R	N	D	Y	S	S	K	R	R	R	S
LeACS2	12	13	26	27	28	54	55	92	127	128	152	153	157	209	237	240	275	277	278	286	412	429	460
MdACS	4	5	18	19	20	46	47	85	120	121	145	144	150	202	230	233	270	272	273	281	407	424	464
HbACS-D10	10	11	24	25	25	52	53	91	126	127	151	152	157	208	236	239	272	274	275	283	410	427	454

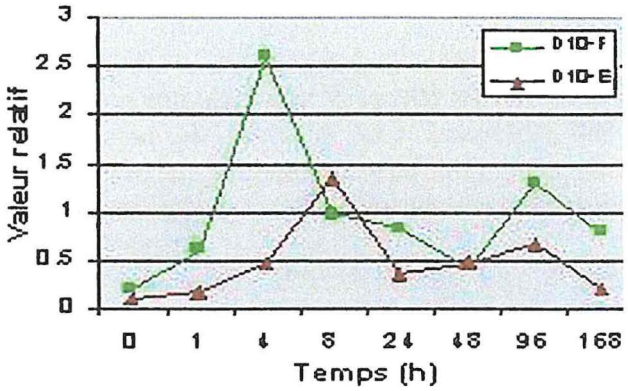

Figure 18. Effet de la stimulation à l'éthylènique (1 ppm d'ethylene) sur l'accumulation de transcrits de l'*HbACS-D10* dans les feuilles et des écorces de jeunes plantes greffes PB260

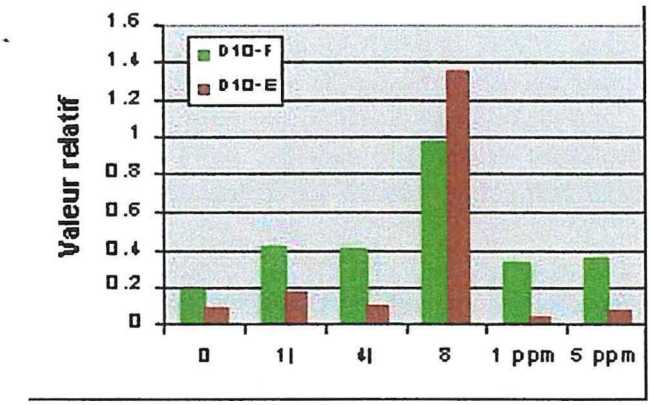

Figure 19. Effet de 1-MCP sur l'accumulation e transcrits de *HbACS-D10* dans les feuilles et des ecorces

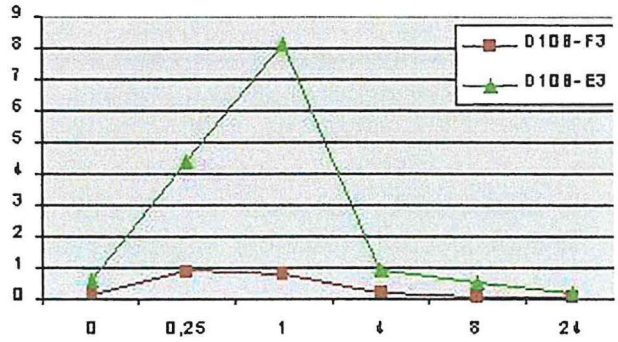

Figure 20. Effet de la blesure sur l'expression d'*HbACS-D10* dans les feuilles et des écorces

3.5. DISCUSSION ET CONCLUSION SUR LA CARACTERISATION DES GENES *ACS CHEZ H. BRASILIENSIS*

Parmi les 5 fragments partiels isolés, les parties 3' non codantes pour 3 clones (*ACS-F3, ACS-F10, ACS-D10*) ont pu être obtenues. Les analyses de comparaison de séquence et d'hybridation moléculaire de type *Southern* permettent de supposer que trois membres différents de la famille multigénique codant les ACS ont pu être isolés chez *H. brasiliensis*.

Pour tous les membres HbACS, une sérine dans la séquence « RSLF » de la région C-terminale a été identifiée. Elle pourrait correspondre à celle conservée en position 460 chez LeACS2, et qui est le site de la phosphorylation. Ainsi, ces gènes *HbACS* pourrait appartenir au type 1 des *ACS* pour lesquelles il n'y a pas de régulation par le gène *ETO1* (ETHYLENE OVERPRODUCER 1) selon la classification de Yoshida (Yoshida *et al.*, 2005). En effet, ce dernier est un régulateur négatif de la production d'éthylène *via* son interaction avec *AtACS5*.

Pour le gène *HbACS-D10* pour lequel la séquence pleine longueur est isolée, la forte similarité avec les gènes *AtACS2* et *AtACS6* permet de suggérer que la protéine correspondante à D10 est phosphorylée par une MAP kinase. En effet, parmi les deux kinases responsables de la phosphorylation de la sérine, CDPK et MAP kinase (Ecker, 2004), c'est la MAP kinase qui est généralement activée par les stress biotiques et abiotiques (Liu & Zhang, 2004). Liu et Zhang ont aussi rapporté que AtACS2 et AtACS6 ont pour substrat la MPK6. Cela conduit à une accumulation de protéines ACS, une activité ACS plus élevée et une production d'éthylène. De nombreux stimuli activent la MPK6 d'*Arabidopsis thaliana* ou ses orthologues chez d'autres espèces.

L'expression du gène *HbACS-D10* est induite à la fois par l'éthylène et la blessure. Cette réponse est plus forte dans les feuilles lors du traitement éthylène et inversement plus forte dans les écorces lors de la blessure. Cela suggère que ce gène joue un rôle dans la réponse aux stress environnementaux chez l'hévéa. Les études de son expression ont montré une accumulation transitoire de ses transcrits lors de l'application d'éthylène à la fois dans l'écorce et les feuilles de jeunes plants greffés. L'induction dans les feuilles est plus rapide que dans l'écorce avec respectivement des pics d'expression à 4 et 8 heures après traitement ce qui rendrait compte des contraintes physiques de diffusion de l'éthylène plus forte au niveau des écorces que des feuilles. Dans le cas de la blessure, ce décalage n'est pas visible du fait que l'expression de ce gène dans l'écorce est très forte. La régulation de ce gène par la blessure est probablement transcriptionnelle étant donné que des boîtes spécifiques de la réponse à la blessure ont été découvertes dans les promoteurs des gènes *ACS* chez *Arabidopsis thaliana* (Wang *et al.*, 2005). La signification biologique du deuxième pic d'expression plus faible 96 heures après traitement est difficile à cerner. Le maintien des plants dans un caisson étanche pourrait toutefois engendrer des phénomènes de stress parasites.

L'effet spécifique de l'éthylène a été démontré à l'aide d'un inhibiteur de l'action de l'éthylène, le 1-MCP qui bloque les récepteurs éthyléniques. Un prétraitement avec 1 ou 5 ppm de 1-MCP permet d'abolir l'effet de l'éthylène dans les feuilles et les écorces.

La blessure induit très rapidement, 15 minutes après traitement, l'accumulatiion des ARNm de *HbACS-D10* dans l'écorce et les feuilles. Ce résultat est tout à fait cohérent avec ceux obtenus chez la tomate pour les gènes *LeACS7* (Shiu *et al.*, 1998) et *LeACS2* (Lincoln *et al.*,

1993). Cette rapidité de la réponse à la blessure par rapport à l'éthylène suggère un effet spécifique aussi de la blessure. L'éthylène et la blessure agiraient donc sur la régulation du gène *HbACS-D10* de façon indépendante. Ce rôle initial de la blessure sur l'expression d'un gène de biosynthèse de l'éthylène est tout à fait cohérent avec les observations menées sur des arbres exploités pour lesquels on a une synthèse d'éthylène endogène provoquée par les saignées récurrentes (Siwei *et al.*, 1986). D'autres mécanismes ne sont pas à exclure. En effet, la blessure et l'auxine sont connues pour agir sur l'expression de *AtACS2* et *AtACS6* et donc probablement sur la synthèse d'éthylène.

4. ISOLEMENT ET CARACTERISATION DES GENES CODANT L'ACC OXYDASE

4.1. ISOLEMENT DES ADN$_C$ ET DES GENES PLEINES LONGUEURS

4.1.1. Isolement des séquences partielles

Comme pour le clonage des ADNc et des gènes *ACS*, nous avons défini des amorces dégénérées dans les régions les plus conservées des gènes *ACO* publiés dans les bases de données afin d'isoler des fragments partiels des ADNc et des gènes *ACO* chez *H. brasiliensis* (Tableau 4). Des amplifications par PCR ont ensuite été réalisées avec ces amorces à partir de différentes matrices d'ADN tels que de l'ADN génomique d'hévéa, des populations d'ADNc simples brins obtenus à partir d'extraits d'ARN totaux de feuille, de cal et d'écorce de jeunes plants d'hévéa soumis ou pas à une stimulation de 24 heures à l'Ethrel™, ou encore à partir de deux banques phagiques d'ADNc de méristèmes caulinaires et d'écorce d'hévéa. Quinze produits d'amplification allant de 236 à 839 pb ont pu être obtenus à partir d'ADNc simples brins de cal, d'écorce (stimulé ou pas par l'Ethrel), de feuille ainsi qu'à partir de la banque d'écorce.

Ces produits PCR ont été clonés dans le vecteur p-GEM-T-Easy puis séquencés. L'analyse BlastN des séquences clonées montre une forte homologie (80%) avec des séquences de gènes ACC oxydase isolées chez d'autres espèces (Tableau 16). L'alignement des séquences des clones partiels à l'aide du programme ClustalW a permis de grouper les séquences identiques et de sélectionner les clones les plus représentatives de la diversité et les plus longues pour chaque groupe (Tableau 17). Ainsi, les séquences hévéa ont été classées en 3 groupes et les clones H4, H5 et O48 ont été retenus. Ces clones présentent de fortes similitudes respectivement avec l'*ACO1* de *Populus euramericana* et l'*ACO2* de *Prunus persica.*

Des amorces sens (S) et réverse (R) spécifiques ont été définies pour chacun des gènes retenus afin de pouvoir détecter les séquences correspondantes lors des analyses moléculaires (Tableau 5).

4.1.2. Isolement d'un clone pleine longueur par criblage des banques phagiques d'ADNc

Le criblage de deux banques d'ADNc phagiques d'écorce (Kit Lamda-TriplEx, Clontech, USA) et de méristèmes caulinaires (Kit ZAP-cDNA Synthesis Kit, Stratagene, USA) a été entrepris pour cloner des ADNc pleines longueurs correspondant aux gènes *ACO*. Le premier étalement (Et1) a été réalisé sur 3 boîtes carrées (25.4 cm x 25.4 cm) avec respectivement 200000 pfu/boîte/banque « méristème » et 1 million pfu/boîte/banque « écorce » (Tableau 18). Les membranes obtenues ont été hybridées avec une solution de sondes comprenant respectivement l'ensemble des 4 fragments partiels *ACO* (6.25 ng/fragment). Ainsi, il a pu être isolé 76 et 96 plages respectivement pour les banques Méristème et Ecorce. Quinze plages de lyse par banque et par gène ont été retenues pour le deuxième étalement (Et2). Les phages de 5 plages de l'étalement 2 par plage initiale ont été excisés et convertis en plasmide et clonés dans les souches de *E. coli* SOLR et BM25.8 respectivement pour les banques de méristème et d'écorce.

Tableau 16. Analyse BlastN des groupes de séquence *ACO* chez *H. brasiliensis*

Groupes	BlastN						
	Espèces	Gènes	Type	Longueur	e-value	Identité	Hb-aco
1. G11, H8, H7, G10, H11, H9, H6	Populus euramericana	pe-aco-1 mRNA	Cds	1204	e-166	84%	12-772
	Prunus persica	pp-aco-1	Cds	1240	e-130	83%	30-772
2. H4	Popolus euramericana	Pe-aco-1 mRNA	Cds	1204	0	85%	18-784
	Prunus persica	aco	Cds	1240	e-143	83%	18-777
3. G01, H05, H10	Prunus persica	pp-aco2	Partiel cds	810	e-149	84%	127-808
	Rosa hybride (cultivar)	aco	Partiel cds	831	e-148	83%	22-808
	Vitis vinifera	aco1	Partiel cds	1027	e-121	82%	243-808
	Prunus persica	pp-aco2	Complet cds	3416	e-120	84%	
4. G08	Prunus. persica	pp-aco mRNA	Partiel cds	810	e-156	83%	7-816
	Carica papaya	aco mRNA	Complet cds	1471	e-126	82%	1-743
	Rosa hybride	aco mRNA	Partiel cds	831	e-121	81%	7-822
	Carica papaya	aco2 mRNA	Complet cds	1485	e-121	82%	1-743
5. G12, G07, H12	Prunus persica	pp-aco2 mRNA	Partiel cds	810	e-153	84%	1-704
	Rosa hybride	aco mRNA	Partiel cds	831	e-143	83%	1-823
	Vitis vinifera	aco1 mRNA	Partiel cds	1027	e-123	82%	1-786
	Prunus persica	aco2 gene	Complet cds	3416	e-120	84%	23-588
					7e-24	87%	595-710
6. G03	Zea mays	CL31457_1 mRNA sequence	-	880	3.1	100%	421-440
7. G06	C. sativus	mRNA for heat shock protein 70 (hsp70)	-	2511	4e-35	86%	44-213
	Pisum sativum	Chloroplast stomatal 70 kDa heat shock protein mRNA	complet cds	2474	5e-34	84%	22-213
	Citrulus lanatus	Hsp70 precursor mRNA	complet cds	2430	5e-31	85%	44-210
8. G04	Malus x domestica	Aco mRNA	complet cds	1214	0.63	96%	1-25
	Arabidopsis thaliana	Clone 255818 mRNA	complet cds	610	2e-04	89%	176-222
9. H01	Arabidopsis thaliana	Putative O-linked GlcNac transferase (At3g04240)	Complet cds	2965	1e-08	84%	323-408
	Arabidopsis thaliana	O-linked N-acetyl glucosamine transferase	Complet cds	3305	1e-08	84%	323-408
10. G05, H02, G09	Populus euramericana	Pe-aco-1 mRNA	Complet cds	1204	0	85%	55-839
	Prunus persica	Pp-aco mRNA	Complet cds	1240	e-144	83%	62-839
	Prunus armeniaca	Aco	Complet cds	1235	e-137	83%	62-839
	Prunus mume	Pm-aco1	Complet cds	1254	e-135	82%	62-839

Tableau 17. Résultat de l'alignement des séquences isolées à partir d'une analyse avec le logiciel ClustalW et sélection de celles représentatives de la variabilité des populations des clones

Matrices			PCR1		Tailles produits	Noms séquences sélectionnées	Degrés homologie	Sites homologues	Gènes *ACO* homologues
Tissus	Ethrel (%)	Acide nucléique	Amorce sens	Amorces antisens	(pb)		(%)		
Ecorce	0	ADNc sb	Aco-D1-F	Aco-D3b	1000	H5	84% (e-149) 82% (e-121)	127-808 243-808	Aco2 (Prunus persica) Aco1 (Vitis vinifera)
Ecorce	2,5	ADNc sb	Aco-D1-F	Aco-AS	1000	H4	85% (0)	18-784	Aco2 (P.euramerica)
Génomique	0	ADN	Aco-D1-F	Aco-D3-R	1000	04.3	85% (2^e-52) 85% (e-52)	7-261 1-255	Aco1 (Vitis vinifera) Aco2 (Prunus persica)
Génomique	0	ADN	Aco-D1-F	Aco-D3-R	1000	04.8	85% (e-103) 84% (e-95)	361-835 332-803	Aco1 (Populus euramericana) Aco2 (Betula pendula)

Seules les colonies issues de la banque de méristème ont pu être amplifiées et envoyées pour séquençage des inserts plasmidiques. Parmi les 15 colonies envoyées au séquençage (1 colonie par phage isolé lors de l'étalement 2), seules 5 ont permis une lecture. Ces séquences correspondent à des gènes connus (α-expansine, eIF4A-8, glutamine perméase) mais n'ont pas d'homologie avec l'*ACO*.

En ce qui concerne la banque d'écorce, étant donné l'absence de croissance des colonies BM25.8pTriplex, le clonage des produits amplifiés à partir des plages de l'étalement 2 a été réalisé. Il a été obtenu 8 produits PCR à partir des plages isolées suite à l'hybridation avec les sondes *ACO*. Ces fragments ont été clonés dans DH5αpGemTeasy et des tests PCR utilisant des amorces spécifiques des différents fragments partiels ont été réalisés. Seul le couple d'amorces correspondant au fragment H5 permet une amplification, le clone en question était le O3A. Des analyses de séquence ont montré qu'il s'agissait bien du même gène (cf § Analyse *in silico*). Ce gène qui sera appelé *HbACO-H5* fait 1215 pb avec une phase ouverte de lecture de 936 pb codant 312 acides aminés.

Pour les autres clones, l'analyse des séquences révèle des homologies avec les gènes suivant : *thioredoxin, starvation protein, pectate lyase, ascorbate peroxydase, oxydase, cell wall protein* et 6 autres sans homologie avec des gènes connus.

4.1.3. Extension des extrémités 5' et 3' des clones partiels d'ADNc par RACE-PCR

L'extension de tous les fragments partiels des gènes ACO a été entreprise par 5' et 3' RACE-PCR. Dans ce but, des amorces spécifiques comportant des Tm élevés (de 65 à 70°C) ont été définies (Tableau 6). Ce sont les amorces suivantes qui ont permis l'extension des fragments partiels : H4-R2-98-5'Race ; H4-S1-283-3'Race ; O48-R1-63-5'Race ; O48-S2-121-3'Race

Les produits PCR obtenus ont été clonés dans p-GEM-T-Easy (Promega) et séquencés. L'analyse des séquences montre qu'il s'agit bien de fragments de gènes codant des ACO. Des reconstructions de ces gènes ont pu être réalisées *in silico* pour les clones initiaux H4 et O4.8. Ainsi, des amorces spécifiques positionnées aux extrémités 5' et 3' de ces gènes reconstruits ont été définies pour amplifier les ADNc et les ADNg pleines longueurs.

4.1.4. Isolement des séquences ADNc et génomiques pleines longueurs

Sur la base d'amorces positionnées aux extrémités 5' et 3' des clones isolés, les séquences pleines longueurs ADNc et génomiques ont été clonées. Pour limiter les risques d'erreur lors de la polymérisation, nous avons utilisé une *Taq* polymérase à activité « *Proofreading*» à partir de l'ADNc simple brin directement issu de la rétro-transcription. Trois PCR ont généralement été réalisées en parallèle et les séquences de 3 produits ont été comparées pour s'assurer de la bonne qualité des clones retenus comme séquence de référence pour les gènes *HbACO*.

Les ADNc pleines longueurs des clones *HbACO-H4, HbACO-H5* et *HbACO-O48* ont ainsi pu être isolés. Ils font respectivement 1183, 1115 et 1348 pb comprenant des ORF de 954, 936 et 954 pb.

Tableau 18. Bilan du criblage des banques phagiques d'ADNc de méristème et d'écorce chez *Hevea brasiliensis*.

Banques ADNc	amplifiées	Etalement 1		Etalement 2	Excision/	Séquençage			
Tissus d'origine	Titres (pfu/µL)		PCR		Conversion	Plasmide (Nb clones)	(séquences)	Produit PCR cloné (Nb clones)	(séquences)
Méristème	$1,04x10^7$	$2x10^5$/boîtex 3		1 boîtex15 plages	SOLR pLambda				
		76 plages	76 +	8-20 plages/boîte	75	1clone/plagesEt1	α–expansine eIF4A-8 3 glu.perméase	Nd	
Ecorce	$4,48x10^8$	$1x10^6$/boîtex 3		1 boîtex15 plages	BM25.8 pTriplex				
		96 plages	8+	8-20 plages/boîte	75	0/75 (croissance -)	négatif	8	2 Thioredoxin Starvation protein Pectate lyase Ascorbate peroxydase **ACO 1** (O3A)

Pour deux de ces clones, *HbACO-H4* et *HbACO-H5,* nous avons pu cloner les séquences génomiques correspondantes hors promoteurs. Les séquences de ces clones ont respectivement une longueur 1418 et 1456 pb. Le gène *HbACOH4* comprend 2 introns et 3 exons tandis que le gène *HbACOH5* est constitué de 3 introns et 4 exons (Figure 21).

4.1.5. Evaluation du nombre de gènes *ACO* chez *H. brasiliensis*

L'évaluation du nombre de gènes *ACO* chez l'hévéa a été réalisée par hybridation moléculaire de type *Southern* sur de l'ADN génomique de 3 clones d'hévéa (RRIM 600, PB 260, PB 217) (Figure 22). Le marquage a été réalisé avec une sonde dans la séquence *HbACO-H5* correspondant à une partie homologue de toutes les *HbACO*. L'hybridation révèle jusqu'à 7 bandes pour *Eco*RV. Des différences d'intensité et de taille de bandes entre les 3 clones d'hévéa signifieraient un certain degré de polymorphisme

4.1.6. Analyse *in silico* des séquences pleines longueurs isolées

4.1.6.1. Analyse de la séquence et structure du gène HbACO-H4

La séquence génomique correspondant au gène *HbACO-H4* a une longueur de 1416 pb hors promoteur et séquence polyA (Figure 21 ;Figure 23). Ce gène est composé de régions 5' et 3' non traduites (de 107 et 120 pb), de 3 exons (de 102, 227 et 625 pb) et de 2 introns (de 92 et 143 pb).

4.1.6.2. Analyse de la séquence et structure du gène HbACO-H5

La séquence génomique correspondant au gène *HbACO-H5* a une longueur de 1454 pb hors promoteur qui n'a pas été isolé (Figure 21 ; Figure 24). Ce gène est composé de régions 5' et 3' non traduites (de 40 et 137 pb), de 4 exons (de 105, 227, 334 et 270 pb), de 3 introns (de 124, 98 et 119 pb).

L'analyse BLASTX montre que le plus proche de HbACO-H5 est une ACO-1 de *Gossypium barbadense* d'une longueur totale de 1141 pb présentant 77% d'identités avec HbACO-H5 et un E^{value} de $2e^{-88}$. Le second est une *ACO* de *Carica papaya* présentant 76% d'ientités et un E^{value} de $4e^{-87}$. D'une manière intéressante, la $5^{ème}$ est une *ACO* de *Hevea brasiliensis* isolée à partir d'ARN d'écorce (Kongsawadworakul & Chrestin, 2004), présentant 75% d'identités et un E^{value} de $5e^{-87}$.

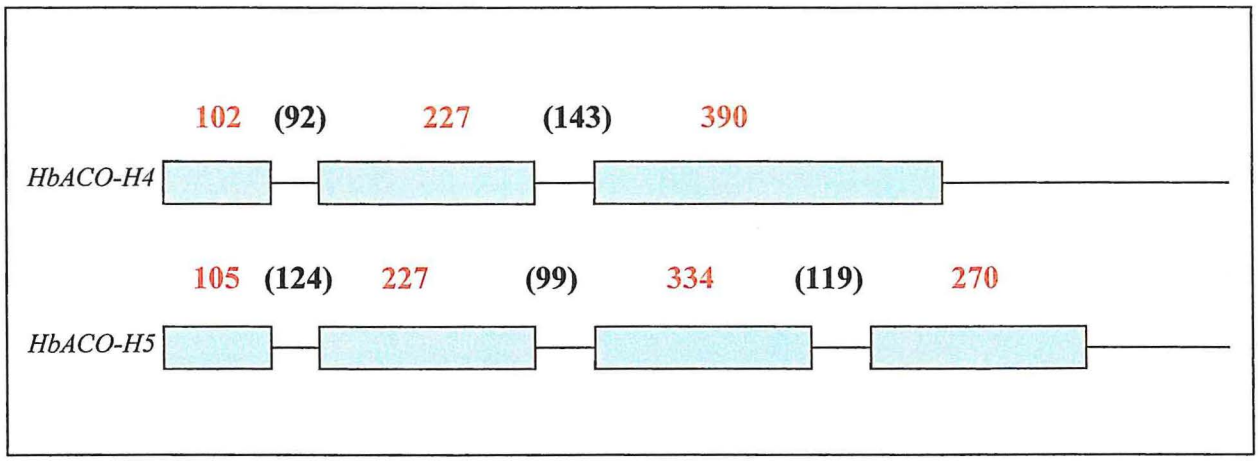

Figure 21. Structure des gènes *HbACO-H4* et *HbACO-H5*. Les exons sont représentés en boîtes bleus et les introns par des lignes noirs entre les exons.

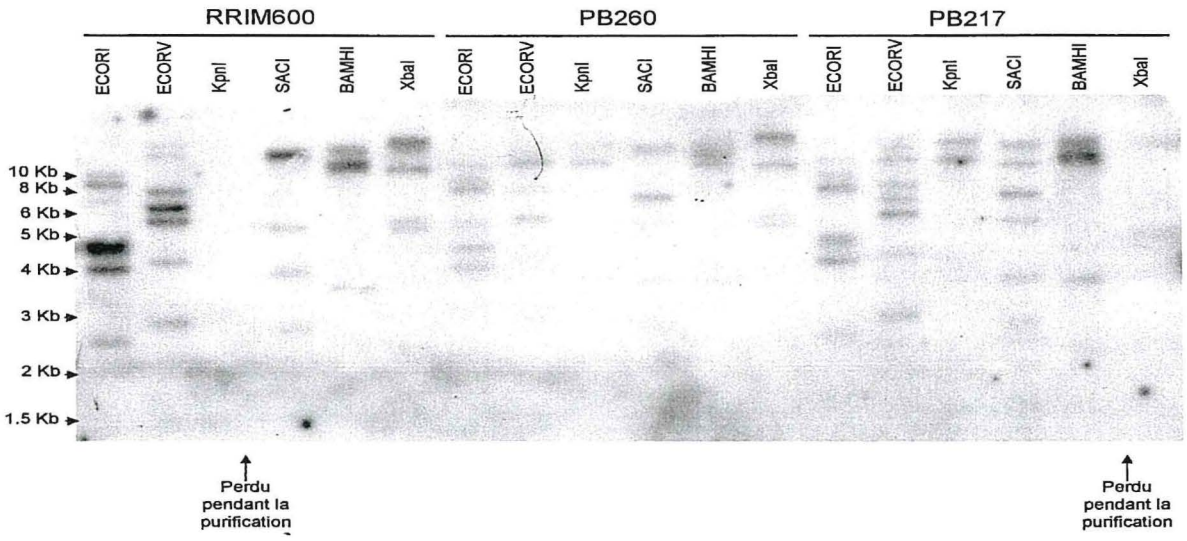

Figure 22. Hybridation moléculaire de type *Southern* d'une sonde correspondant à la partie codante du gène *HbACO-O48* sur de l'ADN génomique de 3 clones d'*H. brasiliensis* (RRIM 600, PB 260, PB 217). Pour chacun des clones, 8 µg d'ADN génomique ont été clivés par différentes enzymes de restriction (*Eco*R1, *Eco*RV, *Kpn*1, *Sac*1, *Bam*H1, *Xba*1).

4.1.6.3. *Trois membres pour la famille multigénique codant les ACO chez H. brasiliensis*

La comparaison des séquences *HbACO* pleine longueur avec celles des bases de données NCBI en utilisant le programme BLASTN et BLASTX a permis de caractériser la structure des gènes et de prédire la fonction ACC oxydase pour les protéines codées. L'analyse des séquences nucléotidiques et peptidiques déduites confirme que 3 membres différents de la famille multigénique codant des ACO chez *Hevea brasiliensis*. En sus du polymorphisme de longueur enregistré, une faible conservation de séquence dans les régions 5' et 3' non codantes est notée. Les deux séquences génomiques *HbACO-H4* et *HbACO-H5* se différencient aussi par leur structure. Toutefois, la jonction intron/exon est représentée par le site d'épissage conventionnel GT/AG. La position des introns est généralement conservée pour les gènes connus des espèces végétales.

Les gènes *HbACO* peuvent être classés en trois groupes en fonction du nombre et de la taille des exons (Figure 25).
Les gènes *ACO* comportant 4 exons de taille relativement constantes entre espèces (105 pb pour le premier exon et 224 ou 227 pour le second, 334 ou 337 pour le troisième et 279 à 327 pour le dernier). Du fait de sa structure, le gène *HbACO-H5* peut être classé dans le groupe composé des gènes *CmACO1, CpACO1, LeACO1, LeACO2, LeACO3, MdACO1, MdACO2, MdACO3, MhACO2, PpACO1.*
Les gènes comportant 3 exons de 102, 221 ou 224, 580 ou 592 pb : *CmACO2* ; *Mh-ACO1. HbACO-H4* pourrait appartenir à ce groupe ayant des exons de 102, 227 et 625 pb.
Les gènes comportant 3 exons dont le deuxième est très long (561 pb) : *Cm-ACO3.*

Ne connaissant la séquence génomique du gène *HbACO-O48,* il est difficile d'identifier les sites d'épissage pour ce gène qui en comporte potentiellement plusieurs aux $100^{ème}$, $102^{ème}$, $227^{ème}$, $229^{ème}$ et $625^{ème}$ nucléotides. L'isolement de la séquence génomique est donc un objectif primordial pour mieux caractériser ce gène.

4.1.7. Analyse phylogénique

Les séquences déduites des protéines codées par les gènes *HbACOs* ont été comparées à celles des *ACOs* d'autres espèces disponibles dans la base de données SWISSPROT. Cette base de données permet de disposer de séquences complètes de protéines dont la fonction a souvent été validée. Toutefois, les accessions relatives aux familles ACO d'*A. thaliana* ou bien de *L. esculentum*, deux espèces modèles pour la biosynthèse de l'éthylène, ne semblent pas complètes et ne permettent pas de faire une analyse comparative des HbACO avec l'une ou l'autre de ces familles. Les résultats de cette analyse sont présentés sous forme d'arbre comparant plusieurs espèces (Figure 26). Celui-ci nous permet de visualiser que les HbACOs sont positionnés dans différents groupes :

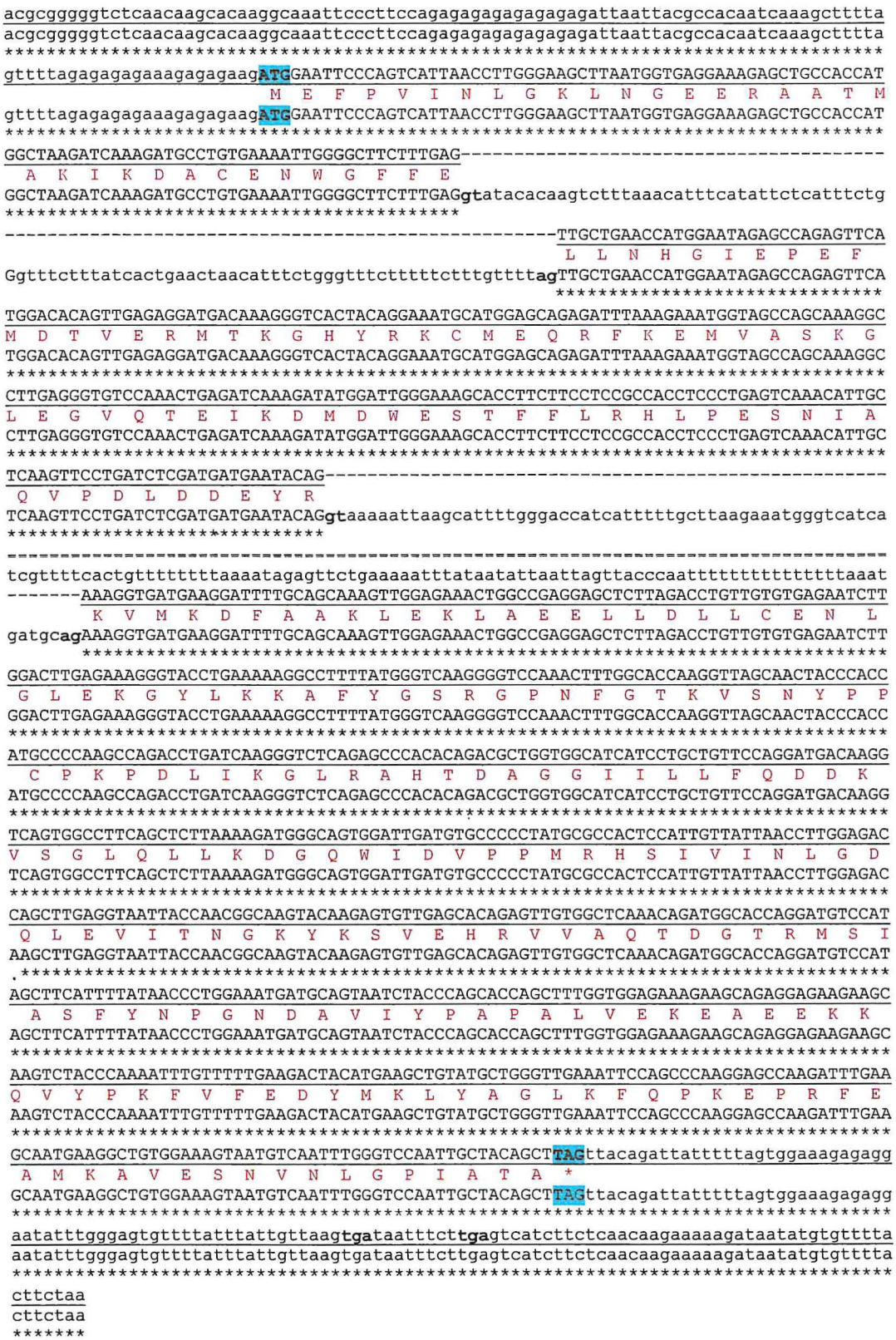

Figure 23. Structure de la séquence génomique de *HbACO-H4* et de la protéine codée par ce gène. La séquence ADNc est soulignée. La traduction de la phase ouverte de lecture est en lettres rouges. Les parties non codantes (5'-UTR, introns et 3'-UTR) sont en lettres minuscules. Les exons sont en majuscules.

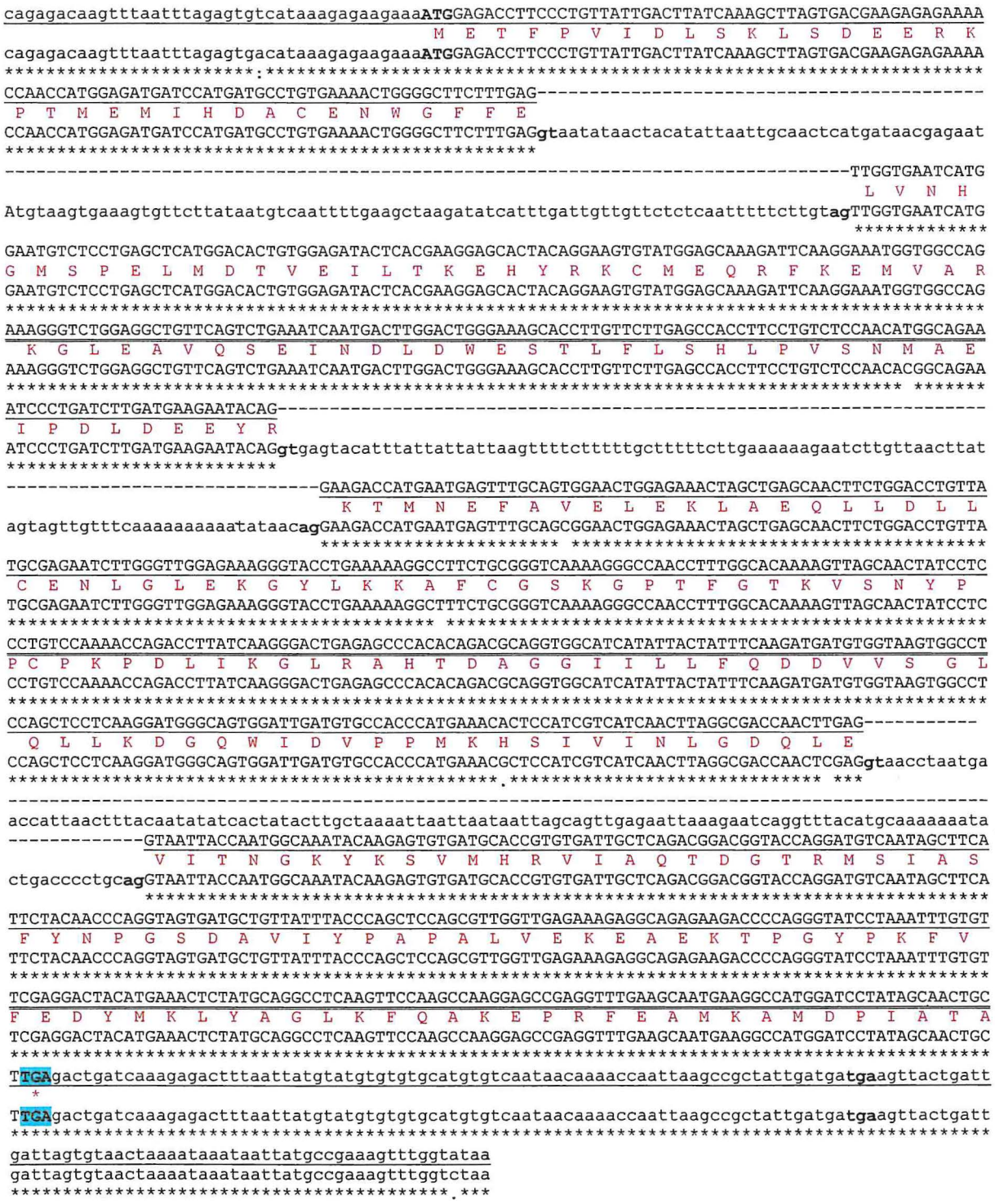

Figure 24. Structure de la séquence génomique de *HbACO-H5* et de la protéine codée par ce gène. La séquence ADNc est soulignée. La traduction de la phase ouverte de lecture est en lettres rouges. Les parties non codantes (5'-UTR, introns et 3'-UTR) sont en lettres minuscules. Les exons sont en majuscules.

HbACO-H4 et HbACO-O48 se retrouvent dans le même groupe avec : une ACO de *Prunus* (Q9MB94), les ACO1, ACO2 et ACO4 de *Lycopersicum esculentum* (P05116, P07920, P24157), les ACO1, ACO3 et ACO4 de *Petunia hybrida* (Q08506, Q08507, Q08508) et la ACO de *Dryospiros kaki* (Q85932).

HbACO-H5 se retrouve dans un groupe comportant une ACO de kiwi (*Actinidia delicios*, P31237), une ACO de pois (P31239), les ACO1 et ACO2 de pommier (*Malus domestica*, Q00985, O48882), et l'ACO3 de melon (P54847).

L'existence de ces 2 groupes pourrait signifier que ces gènes possèdent des rôles et des régulations différents.

4.1.8. Structure des protéines et identification des résidus d'acides aminés critiques pour la fonction enzymatique

L'alignement multiple des séquences peptidiques traduites obtenues à partir des séquences nucléotidiques *HbACOs* et celles d'autres espèces révèle une forte conservation (81 à 89% d'acides aminés identiques) entre ces séquences (Tableau 19). Les acides aminés formant les sites de liaison du Fe (II) ou bien de la fixation du co-substrat sont conservés chez toutes les HbACOs.

Cet alignement permet également d'observer que la HbACO-H4 isolé chez le clone PB 260 présente 100% d'identités avec une HbACO isolée chez le RRIM600, numéro d'accession AAP41850 (Figure 27). Cela signifie qu'il y a une forte conservation des séquences entre ces deux clones d'hévéa et que le polymorphisme observé lors de l'analyse Southern est probablement le fait des autres isoformes.

Les ACO sont des membres de la superfamille des oxygénases et oxydases qui utilisent un Fe(II) comme cofacteur et 2-oxoglutarate (2OG) comme co-substrat. Comme la famille structurale des IPNS (*Isopenicillin N Synthase*), ACO n'utilise pas 2OG comme co-substrat. Il semblerait donc que les ACO et les IPNS soient des membres atypiques de ce groupe. Les protéines ACO présentent des similitudes de séquence avec des enzymes de type *non-heme Fe(II)-dependent oxygen activating enzymes*. La présence du motif His-X-Asp-X(53-57)-His est trouvé parmi les ACO et les protéines de type ANS (*Anthocyanin synthase*). Sachant que la structure du cristal des ACO a été déterminée pour les ACO1 de *Petunia hybrida* et de *Malus domestica*, ainsi que pour les protéines AtANS et AnIPNS (*Aspergillus nidulans*), l'alignement des séquences peptidiques HbACO a été effectuée avec celles précitées. Ainsi, les régions conservées parmi les ACO, les ANS et les IPNS ont été identifiées (Figure 28).

De façon générale, cette analyse au niveau de la structure des protéines déduites des séquences *HbACOs* montre qu'il y a :

* 11 α-hélices chez *H. brasiliensis* qui différent légèrement entre elles et avec d'autres ACO.

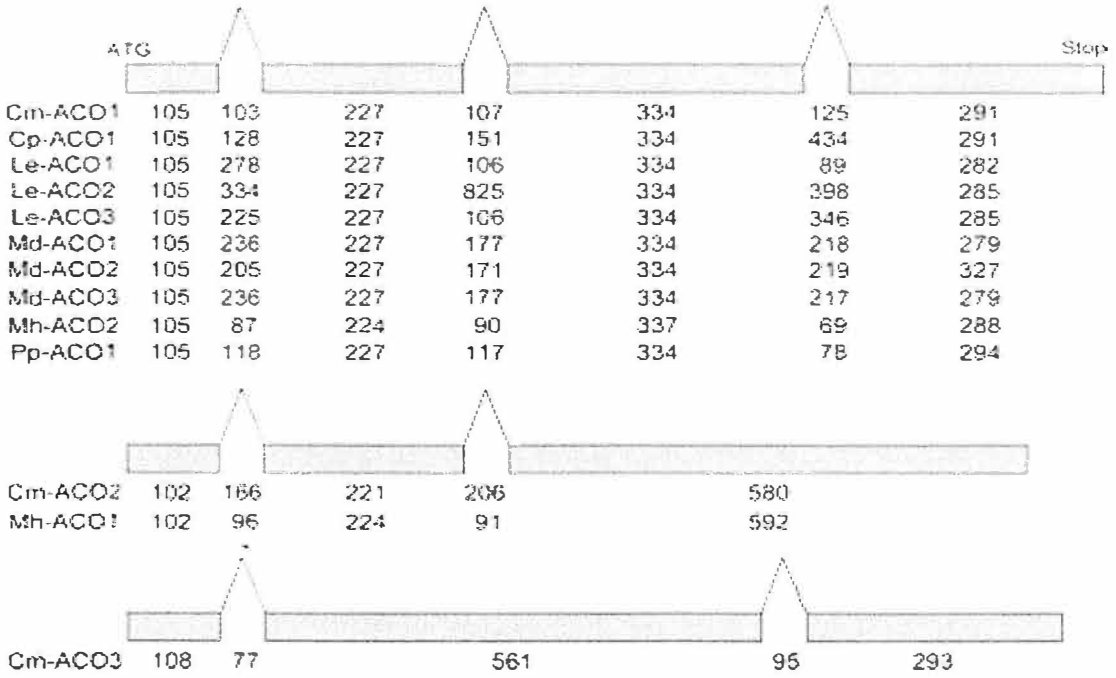

Figure 25. Comparaison des structures des gènes *HbACO* avec celles d'autres espèces : Banane (AF030411 pour Mh-ACO1 et U86045 pour Mh-ACO2), pomme (X98627 pour Md-ACO1, AF015787 pour Md-ACO2, et AF030859 pour Md-ACO3), avocad (M32692 pour Pa-ACO1), kiwi (M97961 pour Ac-ACO1), melon (X95551 pour Cm-ACO1, X95552 pour Cm-ACO2, et X95553 pour Cm-ACO3), papaye (AF379855 pour Cp-ACO1), pêche (AF532976 pour Pp-ACO1) et tomate (X58273 pour Le-ACO1, Y00478 pour Le-ACO2, Z54199 pour Le-ACO3, et AB013101 pour Le-ACO4). Les exons sont indiqués par des boîtes et les introns sont indiqués par les lignes. Les nombres correspondent à la taille des séquences en paire de base.

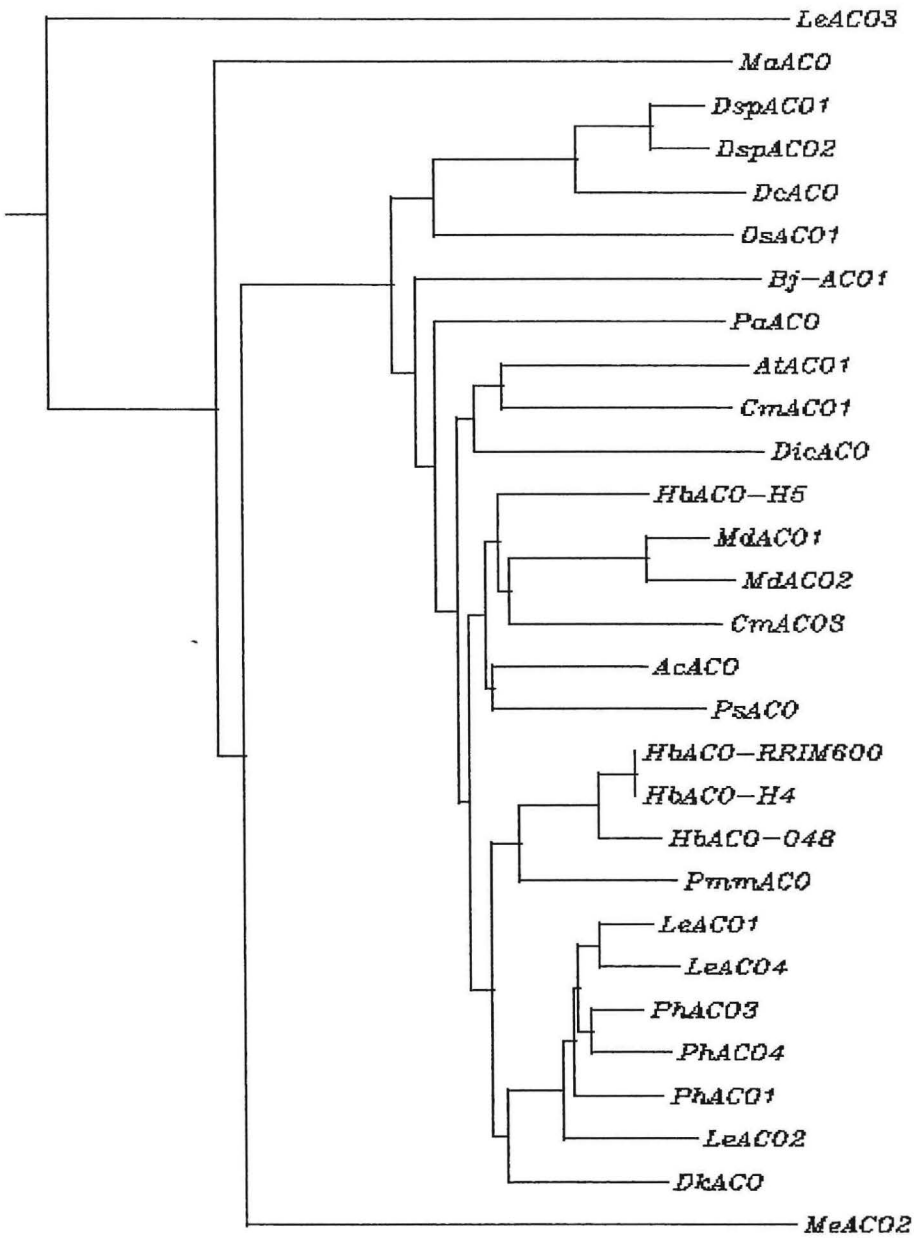

Figure 26. Relation phylogénétique des ACO d'*Hevea brasiliensis* avec les ACO d'autres espèces végétales. Cette analyse a été réalisée à partir des données de la base SWISSPROT : LeACO1 (P05116), LeACO2 (P07920), LeACO3 (P10967), LeACO4 (P24157); PhACO1 (Q08506), PhACO3 (Q08507), PhACO4 (Q08508), MdACO1 (Q00895), MdACO2 (O48882); Cassava MeACO2, OsACO1 (Q40634); Prunus mume PmACO (Q9MB94); kiwi AcACO (P31237); melon CmACO1 (Q04644), CmACO3 (P54847) ; Pisum sativum, PsACO (P31239); avocat PaACO (P19464); bananier MaACO (Q9FR99) ; Arabidopsis AtACO1 (Q06588) ; moutarde Bj ACO1 (Q09052); Hevea brasiliens (4850) ; moth orchid DspACO1 (P31238), DspACO2 (Q39705), Tropical pigeon orchid DcACO (Q9ZQZ1); oeillet DcACO (P31528) ; Kaki persimmon DkACO (Q85932).

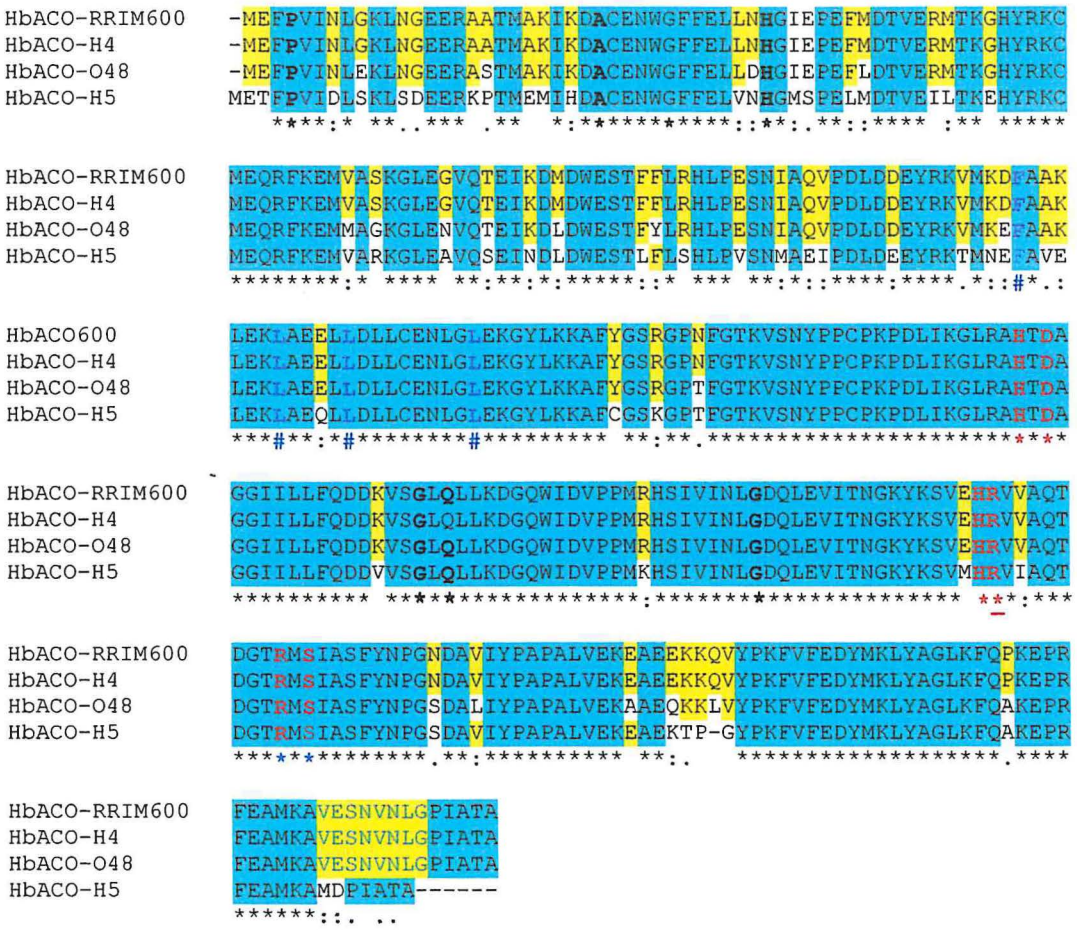

Figure 27. Alignement des séquences peptidiques HbACO du clone PB 260 avec celle du clone RRIM600 (N° accession AAP41850). Les résidus d'acide aminé conservés dans la superfamille des enzymes à Fe2+ et nécessitant un co-substrat ascorbate sont surlignés en jaune (*). Les motifs de liaison avec le Fe2+ sont le H-D et HR sont écrits en *lettre rouge* (*). Le motif de liaison au co-substrat R-S est aussi marqué en lettre rouge (*). Le motif potentiel *Leucine zipper* est écrit en *lettre bleu* (#) .

Tableau 19. Degré d'identité entre les ACOs connues chez *Hevea brasiliensis* et celles de quelques autres espèces.

Protéines déduites Hevea brasiliensis	Espèces (numéros d'accession des séquences)	Score (%)	Exp	gaps
HbACO-H4	Hevea brasiliensis (AAP41850)	100	$1e^{-169}$	0 % (0/318)
	Populus euramericana (BAA94601-1)	89	$2e^{-152}$	0 % (1/319)
	Polargonum hortorum (AAC48977)	87	$6e^{-149}$	0 % (1/316)
	Prunus armeniaca (AAC33524.1)	86	$2e^{-148}$	0 % (0/316)
	Diospyros kaki (BAB89351.1)	86	$2e^{-147}$	0 % (1/315)
	Prunus mume (BAA90550.1)	85	$6e^{-147}$	0 % (0/316)
HbACO-H5	Gossypium hirsutum (AAZ83342.1)	87	$2e^{-142}$	1 % (6/315)
	Carica papaya (AAC988808.1)	85	$7e^{-142}$	0 % (0/311)
	Prunus persica (AAF36484.1)	84	$1e^{-139}$	1 % (6/317)
	Malus domestica (AAA18566.1)	83	$4e^{-139}$	2 % (7/318)
	Betula pendula (CAA71738.1)	81	$8e^{-138}$	1 % (6/318)
	Actinidia deliciosa (BAA21541.1)	85	$1e^{-137}$	0 % (1/306)
HbACO-O48	Hevea brasiliensis (AAP41850)	94	$1e^{-158}$	0 % (0/318)
	Populus euramericana (BAA94601-1)	89	$2e^{-149}$	0 % (1/319)
	Polargonum hortorum (AAC48977)	87	$3e^{-145}$	0 % (1/316)
	Prunus armeniaca (AAC33524.1)	85	$6e^{-144}$	0 % (0/316)
	Fagus sylvatica (CAD21844.1)	85	$7e^{-143}$	0 % (0/316)
	Prunus mume (BAA90550.1)	84	$1e^{-142}$	0 % (0/316)

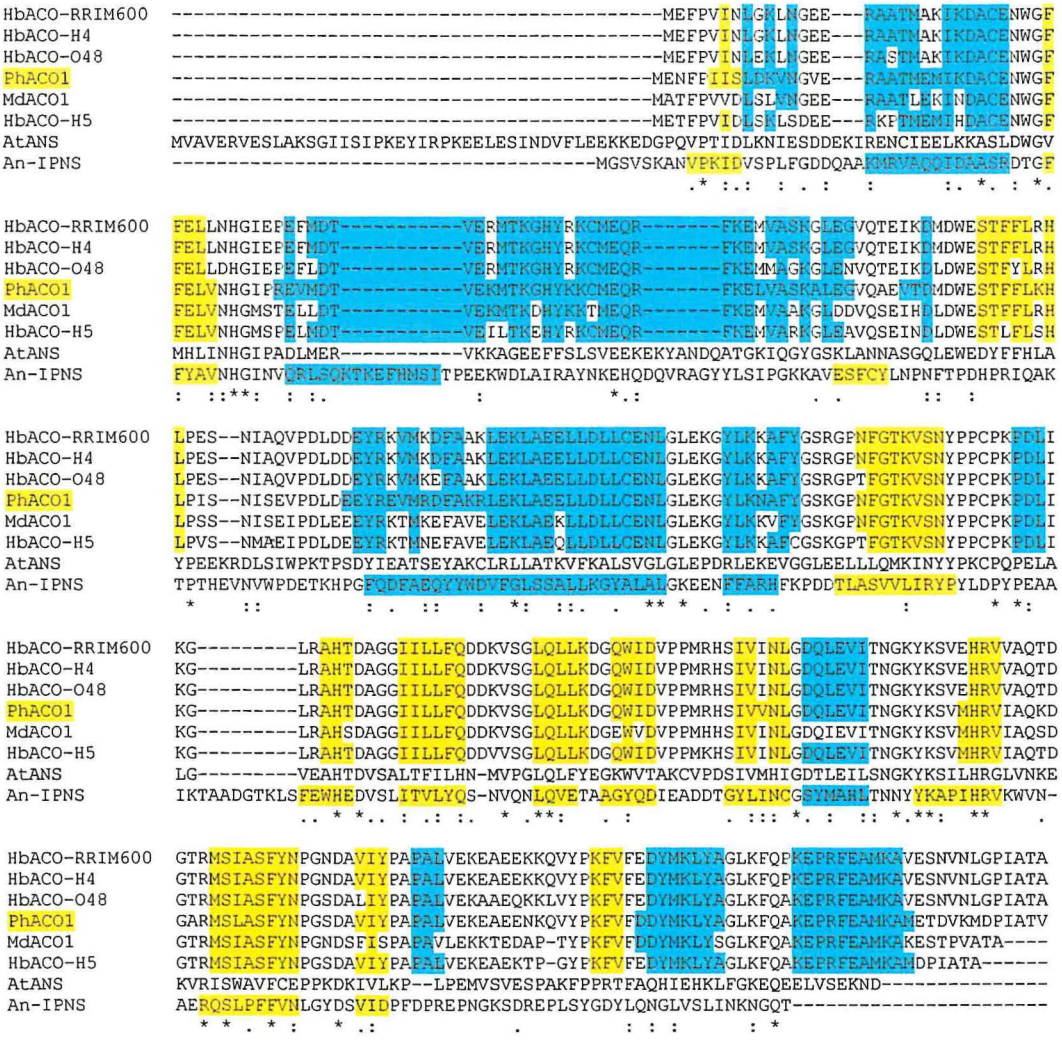

Figure 28. Mise en évidence des motifs impliqués dans l'activité catalytique par alignement des séquences peptidiques HbACO, PhACO1, MdACO1, AtANS et An-IPNS. Les motifs impliqués sont l'hélice α surlignée en bleu et le feuillet β en jaune.

* 13 β-hélices dont 5 sont très conservés, les 8 autres ayant seulement 1 à 2 résidus variables possibles. On peut noter que les 3 résidus de liaison au Fe(II) sont toujours très conservés pour toutes les espèces. Ces résidus peuvent toutefois changer légèrement de position : His176, Asp178 et His233 chez *H. brasiliensis* ; His177, Asp179 et His234 chez *P. hybrida.*

* 2 sites d'autoclivage entre Leu185-Phe186 et Val213-Ile214 chez tous les HbACO et bien conservés aussi chez le pommier. Bien que le premier site soit toujours conservé chez les espèces analysées ici, le second peut différer avec par exemple chez *P. hybrida* la présence de 2 valines (Val214-Val215) au lieu d'une Val et d'une Ile.

* Le motif RXS, qui est supposé être impliqué dans la liaison du carboxylate de l'ACC (Zhang *et al.*, 2004). Les résidus Arg243 et Ser245 forment ce motif RXS qui avec le résidu Tyr161 est conservé dans la sous-famille structurale à laquelle les ACOs appartiennent. Ces résidus lient le *5-carboxylate oxygen* du 2OG (2-oxoglutarate), cosubstrat des ACO, dans les réactions catalysées par l'ANS (anthocyanine synthase) ou par la DAOCS (*deacetoxycephalosporin C synthase*). Dans le cas de l'IPNS (*isopenicillin N synthase*), les acides aminés du motif RXS se lient à un carboxylate du substrat tripeptide (Roach *et al.*, 1997).

* Les résidus Arg174 et Arg243, qui sont potentiellement considérés comme impliqués dans la liaison du complexe « ACO-Fe-ACC-O_2-bicarbonate » (Zhang *et al.*, 2004). Des changements conformationnels putatifs impliquant Arg174 et Arg243 rendraient le site actif du complexe « enzyme–cofacteurs-substrats » plus refermé que la forme ouverte généralement observée dans la structure du cristal. La forme « ouverte » serait le reflet de la conformation de capture du substrat.

Ces changements de résidus ont des effets sur la structure elle-même de la protéine et sur sa fonctionnalité. En l'absence de bicarbonate, l'ACO subit une inactivation rapide et l'ion métallique catalyse l'autoclivage (Zhang *et al.*, 2004). Les modifications observées, entre *H. brasilensis* et *M. domestica* par exemple, sur les 2 sites de clivage dans la séquence N-terminal pourraient aussi signifier un certain type de régulation de l'activité protéique.

En conclusion, les HbACOs contiennent tous les résidus conservés de la superfamille enzymatique nécessitant le Fe^{2+} et l'ascorbate comme co-substrat, le motif putatif de liaison au Fe^{2+}, le motif putatif de liaison au co-substrat et enfin le site potentiel de facteur à glissière à leucine (*Leucine Zipper*) (Do *et al.*, 2005).

4.2. CARACTERISATION DE L'EXPRESSION DES GENES *ACO* CHEZ *H. BRASILIENSIS*

Les analyses de l'expression des gènes *HbACO* ont été réalisées par RT-PCR semi-quantitative avec une approche multiplexage (gène étudié et contrôle interne). Le transcrit de l'actine a été retenu comme contrôle interne de référence. L'expression d'autres gènes répondant à la stimulation éthylénique, tels que le *HEV* (Hévéine) ou le *REF* (Rubber Elongating Factor), a été étudiée au préalable pour s'assurer de l'efficacité des traitements. Le choix des amorces spécifiques pour chacun des gènes étudiés a été fait pour obtenir une taille de produit PCR autour de 400 pb au-dessus des 200 pb obtenus pour le fragment d'actine (cf. chapitre Matériel et méthodes). Au moins une des amorces par gène a été définie dans la

région 5' ou 3' terminales qui est très spécifique pour chacun des gènes *HbACO* (région 3'-ter pour H5 et O48 ; 5'-ter pour H4).

Dans un premier temps, une caractérisation a été réalisée au cours du développement afin de mieux appréhender les tendances d'expression de ces gènes *HbACO*

Par la suite, la caractérisation des gènes *HbACO* a été approfondie par des études en cinétique des effets de l'Ethrel, de l'éthylène et de la blessure. Les cinétiques ont été réalisées sur de jeunes plants greffés qui ont montré une bonne reproductibilité des niveaux d'expression génique, une facilité d'application des divers traitements et une disponibilité de ce matériel végétal.

Enfin, la localisation de l'expression de ces gènes a été réalisée par hybridation *in situ* des transcrits en collaboration avec le plateau technique PHIV (UMR-1098, Montpellier).

4.2.1. Caractérisation de l'expression des 3 gènes *HbACO* au cours du développement

L'expression des 3 membres isolés (*HbACO-H4, H5, O48*) de la famille multigénique codant les ACO a été étudiée au cours du développement en réponse à l'éthylène. Bien que très faiblement exprimé dans les cals et le latex, les transcrits de ces gènes sont détectables dans tous les tissus et à tous les stades de développement avec 35 cycles de RT-PCR (Figure 29). A 28 et 30 cycles, on peut observer une modulation des niveaux d'expression (Figure 30). Cela permet de décrire un processus de régulation différentielle de l'expression de ces gènes :

* Dans les cals, aucune expression des *ACO* n'est enregistrée.
* Dans les feuilles, on peut noter que l'expression des membres *HbACO-H4* et *HbACO*-H5 est amplifiée par l'Ethrel chez les vitroplants âgés de 2 mois, et totalement induit dans les feuilles de plants greffés cultivés à la serre pour H4. Pour H5, on observe une expression stable avant et après stimulation.
* Dans les racines stimulées à l'Ethrel, on observe l'expression des 3 *ACO*.
* Dans les écorces de plants à quatre niveaux de développement (tiges de vitroplants âgés de 2 mois, écorces de plants greffés de 1 an, écorces d'arbres non exploités de 5 ans et écorces d'arbres exploités de 7 ans), l'analyse par RT-PCR de l'expression des *ACO* montre un comportement variable. Pour *HbACO-H4*, on observe une sur-expression du niveau de base par l'Ethrel. Ce phénomène très fort jusqu'au stade des arbres non exploités de 5 ans tend à s'atténuer pour les arbres exploités. Pour *HbACO-H5*, nous pouvons observer un phénomène de sous-régulation par l'application d'Ethrel. Toutefois, les tiges de vitroplants maintiennent une expression de base après stimulation qui disparaît dans les écorces plus âgées dans lesquelles l'expression du gène n'est plus détectable.
* Dans le latex d'arbres exploités non stimulés, l'expression d'aucun des gènes *ACO* n'est détectable.

4.2.1.1. Caractérisation de la réponse à l'Ethrel

La cinétique d'expression des 3 gènes *HbACO* en réponse à l'Ethrel indique une régulation différentielle à la fois dans les écorces et les feuilles (Figure 31). Parmi les transcrits des gènes *HbACO*, ceux de *HbACO-O48* sont les plus abondants après stimulation à la fois dans

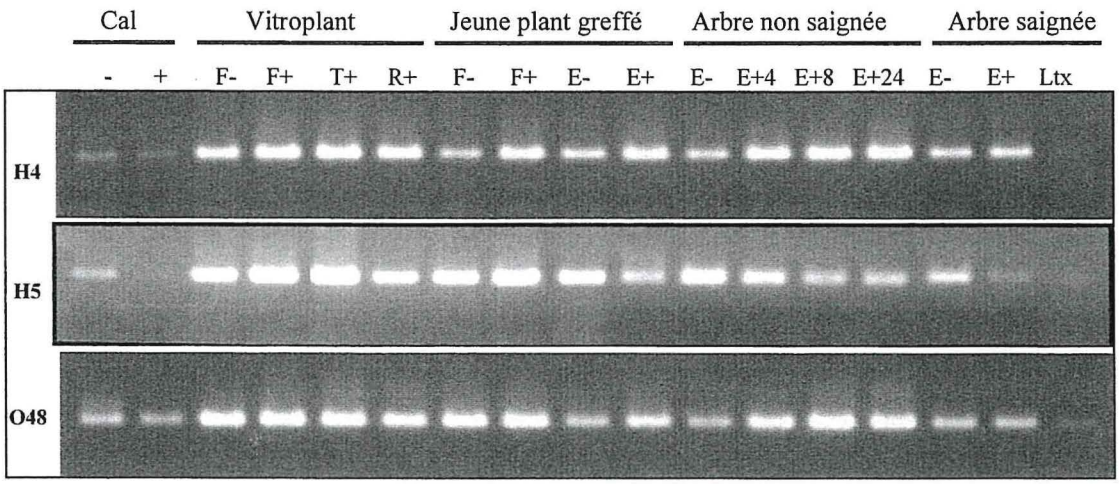

Figure 29. Analyse en conditions saturantes par RT-PCR semi-quantitative (35 cylces) de l'expression des gènes *ACO* dans différents organes en réponse à la stimulation éthylénique et au cours du développement chez *Hevea brasiliensis.* Le matériel végétal a été traité (+) ou non (-) pendant 24 h à l'Ethrel (ou prélèvement 4,8 ou 24 heures après stimulation). Les organes prélevés sont : (F) feuille ; (T) tige ; (R) racine ; (E) écorce ; (Ltx) latex. Les conditions PCR utilisées sont : 94°C-3 min, 35 cycles (94°C-30 sec, 55°C-1 min, 72°C-1 min), 72°C-7 min.

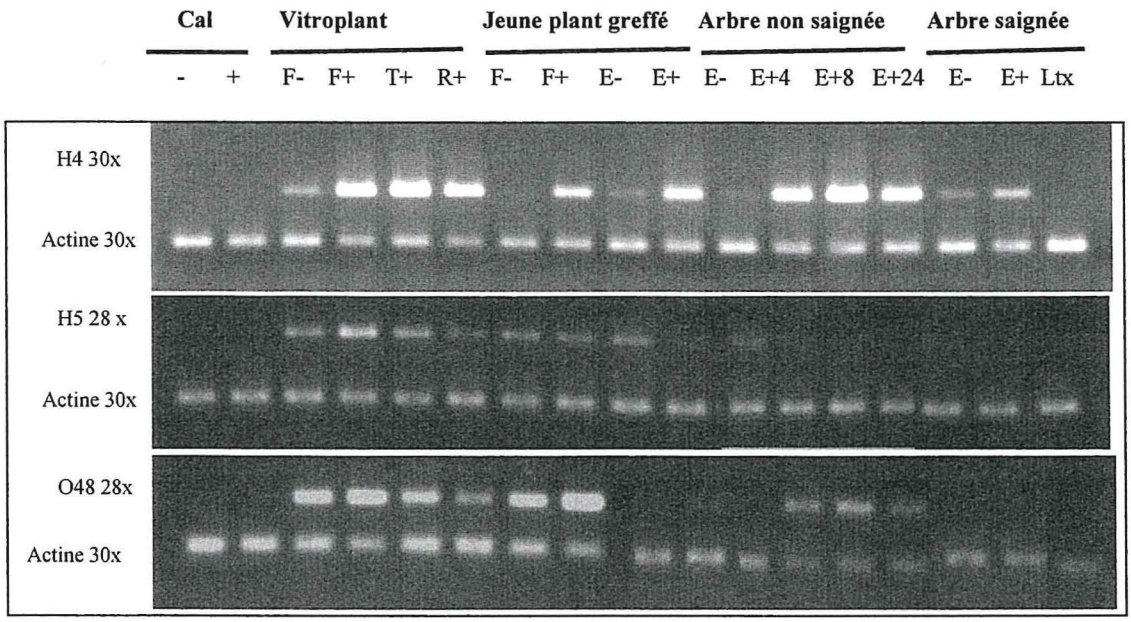

Figure 30. Analyse par RT-PCR semi-quantitative de l'expression des gènes *ACO* dans différents organes en réponse à la stimulation éthylénique et au cours du développement chez *Hevea brasiliensis.* Le matériel végétal a été traité (+) ou non (-) pendant 24 h à l'Ethrel (ou prélèvement 4,8 ou 24 heures après stimulation). Les organes prélevés sont : (F) feuille ; (T) tige ; (R) racine ; (E) écorce ; (Ltx) latex. Les conditions PCR utilisées sont : 94°C-3 min, 28-30 cycles (94°C-30 sec, 55°C-1 min, 72°C-1 min), 72°C-7 min.

les feuilles et les écorces. Dans l'écorce, on observe une régulation positive par l'Ethrel pour *HbACO-H4* et *HbACO-O48*, tandis que *HbACO-H5* est inhibé. Dans les feuilles, les transcrits des 3 gènes s'accumulent suite à l'application d'Ethrel, aucun transcrit n'est présent avant stimulation pour *HbACO-H4*.

Dans l'écorce, l'expression de *HbACO-H4* augmente avec 2 pics d'expression à 1 et 8 heures après traitement. Son niveau d'expression revient à la normale après 48 heures de traitement. L'expression de *HbACO-O48* augmente régulièrement pour atteindre un maximum entre 8 et 24 heures après traitement. Malgré une chute importante, son expression reste légèrement supérieure 168 heures après traitement par rapport à celle enregistrée au départ. L'expression de *HbACO-O48* est de 20 à 30 % supérieure à celle de *HbACO-H4* mais l'induction de ce gène *HbACO-O48* est plus longue que celle de *HbACO-H4*. Contrairement à *HbACO-H4* et *HbACO-O48*, le gène *HbACO-H5* est exprimé sans stimulation et l'application d'Ethrel diminue durablement son expression au-delà des 168 heures observées.

Dans les feuilles, seuls les transcrits du gène *HbACO-H5* et plus fortement ceux de *HbACO-*O48 s'accumulent avant stimulation. Les messagers de ces deux gènes sont aussi présents plus précocement que ceux du gène *HbACO-H4*. Contrairement aux observations faites dans les écorces, les ARNm de *HbACO-H5* augmentent avec un premier petit pic significatif d'expression observé 8 heures après traitement, et puis une seconde vague d'expression 168 heures après traitement. Le gène *HbACO*-H4 suit le profil d'expression de *HbACO-H5* sauf pour la deuxième phase où l'augmentation intervient dès 96 heures après traitement. L'expression du gène *HbACO-O48* est très forte par rapport aux deux autres gènes, elle représente à 24 h après stimulation 4 fois l'expression maximale de *HbACO-H4* ou *HbACO-H5* obtenue à 8 ou 168 heures après traitement.

Ces résultats, obtenus pour de jeunes plants greffés à une unité de croissance (3 mois de développement), sont dans l'ensemble cohérent avec ceux obtenus pour des plants âgés de 1 an ayant développé 3 à 4 unités de croissance (expérience au cours du développement). La seule différence notable est l'absence d'expression de *HbACO-O48* dans les écorces de plants de 1 an stimulées ou non. Cela peut s'expliquer par le fait que les plants plus âgés ont une expression de *HbACO-048* plus faible et très fugace. En effet, la cinétique d'expression de 0 à 24 heures dans des arbres non exploités montre que le pic d'expression est atteint à 8 heures après traitement à l'Ethrel et que l'expression à 24 heures est déjà très faible.

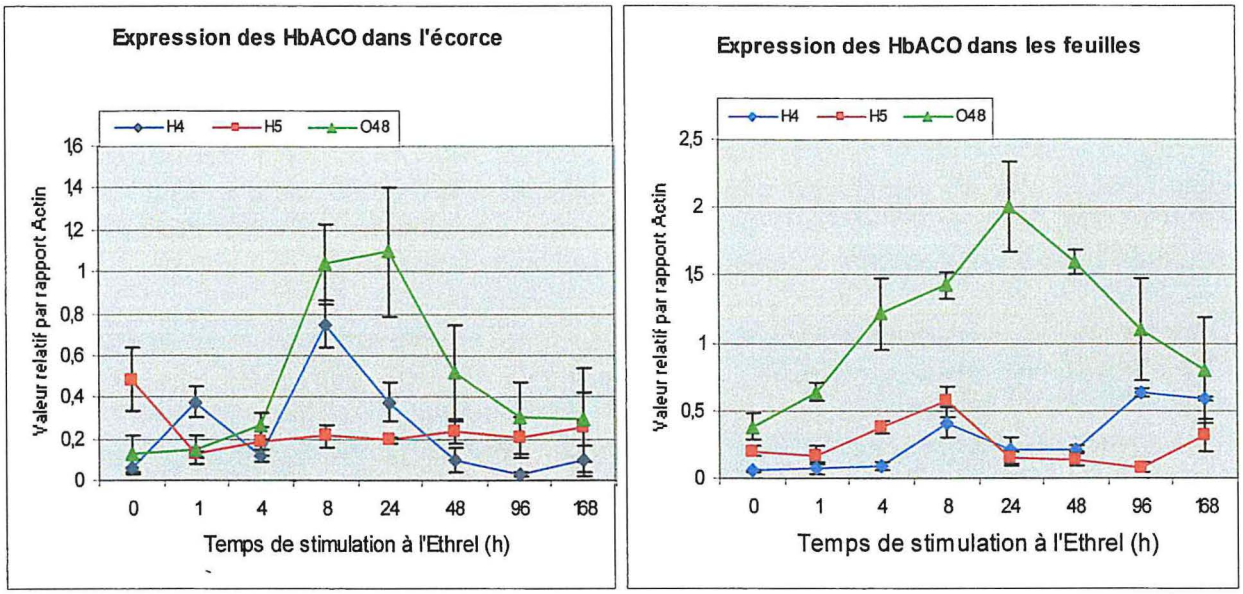

Figure 31. Effet de la stimulation à l'Ethrel sur l'expression des gènes *ACO* dans les écorces et les feuilles de jeunes plants greffés PB 260. Analyse par RT-PCR semi-quantitative. (Chaque point représente la moyenne de 3 répétitions biologiques totalement indépendantes. Trois plants non traités ont été prélevés au temps 0, puis 21 autres plants ont été traités à l'Ethrel (3 plants pour chacun de 7 points restant de la cinétique). Les prélèvements d'écorce et de feuille ont été effectués 1, 4, 8, 24, 48 96 et 168 h après traitement. Les conditions PCR utilisées sont : 94°C-3 min, 18 à 27 cycles (94°C-30 sec, 55°C-1 min, 72°C-1 min), 72°C-7 min. L'actine a subis 24 cycles d'amplification pour chacun des gènes. Pour H4, H5 et O48, l'amplification a été respectivement de 27, 27 et 18 cycles).

4.2.1.2. Caractérisation de la réponse à l'éthylène

L'étude de l'influence de l'éthylène sur l'expression des gènes impliqués dans sa biosynthèse nécessite en sus du suivi des effets de l'éthylène, l'application d'antagonistes de l'action de l'éthylène tel que le 1-MCP (1-méthylcyclopropène). Ces deux produits étant sous forme gazeuse, les jeunes plants ont été placés dans des caissons étanches au gaz pendant le traitement.

Dans le cadre des études menées en caisson (chapitre 3), environ 1 ppm d'éthylène était libérée dans le caisson après stimulation à 2,5 % d'Ethrel, condition de stimulation standard au champ des hévéas. Sachant que des concentrations plus fortes d'Ethrel (5 et 10%) doivent libérer plus d'éthylène et qu'elles provoquent une sénescence rapide des plants (cf. chapitre 3), la dose de 1 ppm d'éthylène a été retenue pour caractériser son effet chez les jeunes plants d'hévéa.

4.2.1.2.1. Effet du caisson

Les plants sont placés la veille du traitement dans les caissons pour éviter le stress dû au déplacement du matériel végétal (Figure 32). Des plants sont prélevés avant puis 24 et 96 heures après fermeture du caisson. L'expression des gènes *HbACO-H4 et HbACO-O48* est légèrement augmentée dans les tissus d'écorce et de feuille. Cette augmentation est très forte dans les feuilles, 10 fois la valeur initiale de *HbACO*-O48 après 96h. Pour *HbACO-H5*, l'effet caisson se ressent légèrement à 96h (+30% de la valeur à 0 ou 24h) dans l'écorce. Par contre, l'effet dans les feuilles est plus marqué avec une baisse de 40% et 65% après respectivement 24 et 96h.

L'effet l'éthylène (8h à 1 ppm) qui est bien plus marqué. Après 96h de fermeture, on observe un effet important au niveau de l'expression de *HbACO-H5* et *HbACO-O48* dans les feuilles. L'analyse de la réponse dans les feuilles au-delà de 24h doit donc être faite avec précaution.

4.2.1.2.2. Effet du 1-MCP

Afin de bloquer totalement les récepteurs éthyléniques, l'action de 0, 1 et 5 ppm de 1-MCP a été testée sur l'expression des gènes *HbACO* (Figure 32). L'atmosphère des caissons est ensuite renouvelée avant l'application de 1 ppm d'éthylène. L'éthylène n'agit alors théoriquement pas sur la régulation des gènes qui en dépendent. L'ensemble des traitements (1-MCP puis éthylène) ne dépasse donc pas les 24 heures pour lesquelles l'effet caisson est minime.

Pour *HbACO-H4* dont la quantité de transcrits est fortement augmentée par l'éthylène (temps 0 h ou 24 h caisson comparé à 0 ppm 1-MCP), une réduction d'expression estimée à 30% et 61-76% en valeur relative respectivement dans l'écorce et les feuilles est observée lors de l'application de 1-MCP. L'effet est d'autant plus marqué que la concentration en 1-MCP augmente de 1 à 5 ppm.

Pour *HbACO*-H5, l'action du 1-MCP est inversée entre les écorces et les feuilles : cet inhibiteur stimule l'accumulation de transcrits *HbACO-H5* dans les écorces tandis qu'il la

réduit dans les feuilles. L'expression de *HbACO-H5* est réduite par l'éthylène à la fois dans les écorces (de 0,20 chez le contrôle à 0.13 chez le traitement éthylène 8h) et les feuilles (de 0,86 à 0,27 unité d'expression). Si on applique le 1-MCP avant l'éthylène, on observe une augmentation de l'expression de 0,13 à 0,3 unité dans les écorces et une baisse de 0,27 à 0,16 et 0,1 respectivement pour 1 et 5 ppm de 1-MCP.

Pour *HbACO-O48*, l'application de l'éthylène provoque une forte accumulation de transcrits estimée à 17,6 fois par rapport au contrôle. Les pré-traitements avec 1 et 5 ppm de 1-MCP réduisent respectivement de 50% (0,31 à 0,15 unité) et de 19% (0,31 à 0,25 unité) l'expression de ce gène par rapport au contrôle stimulé 8 h avec d'éthylène dans les écorces. Dans les feuilles, le 1-MCP agit seulement à 1 ppm avec une baisse de l'expression estimée à 32 % (0,88 à 0,6 unités).

4.2.1.2.3. Effet de l'éthylène en cinétique

Le suivi en cinétique de l'expression des trois gènes étudiés révèle une réponse différentielle très marquée avec des profils spécifiques (Figure 33).

Dans les écorces, seul le gène *HbACO-H5* est activement transcrit dans les plantes non stimulées, son expression est environ 12 fois plus importante que les deux autres gènes *HbACO-H4* et *HbACO-O48*. Après stimulation, une inhibition de l'expression de *HbACO-H5* est observée et elle atteint un minimum à 24 heures. Puis, malgré le maintien de l'application d'éthylène, l'expression de *HbACO-H5* revient à la normale après 48h de stimulation. Pour les deux autres gènes le phénomène s'inverse. L'application d'éthylène provoque l'activation transcriptionnelle des gènes *HbACO-H4* et *HbACO-O48* qui atteignent un sommet après 4h de stimulation. Après 48 h, l'expression du gène *HbACO-H4* est réactivée jusqu'à au moins 168 h.

Dans les feuilles, *HbACO-H5* est toujours le seul gène exprimé sans stimulation. Après injection d'éthylène, l'évolution des profils d'expression est sensiblement équivalente à ceux observés dans les écorces. Seul *HbACO-H4* ne présente qu'un seul pic de transcrits à 4 h, et *HbACO-O48* qui tend à maintenir un fort niveau de transcription jusqu'à au moins 168 h.

D'une manière générale, *HbACOH5* est réprimé par l'éthylène (régulation négative) tandis que *HbACOH4* et *HbACOO48* sont activés fortement et transitoirement (régulation positive).

4.2.1.3. Caractérisation de la réponse à la blessure

L'effet de la blessure sur l'expression des *HbACO* a été étudié en cinétique de 0 à 24h dans les écorces (scarification à l'aide d'un scalpel) ou les feuilles (pincement) (Figure 34). Etant donné que la blessure est connue pour agir très vite sur l'expression des gènes, nous avons réalisé un premier prélèvement dès 15 minutes après blessure.

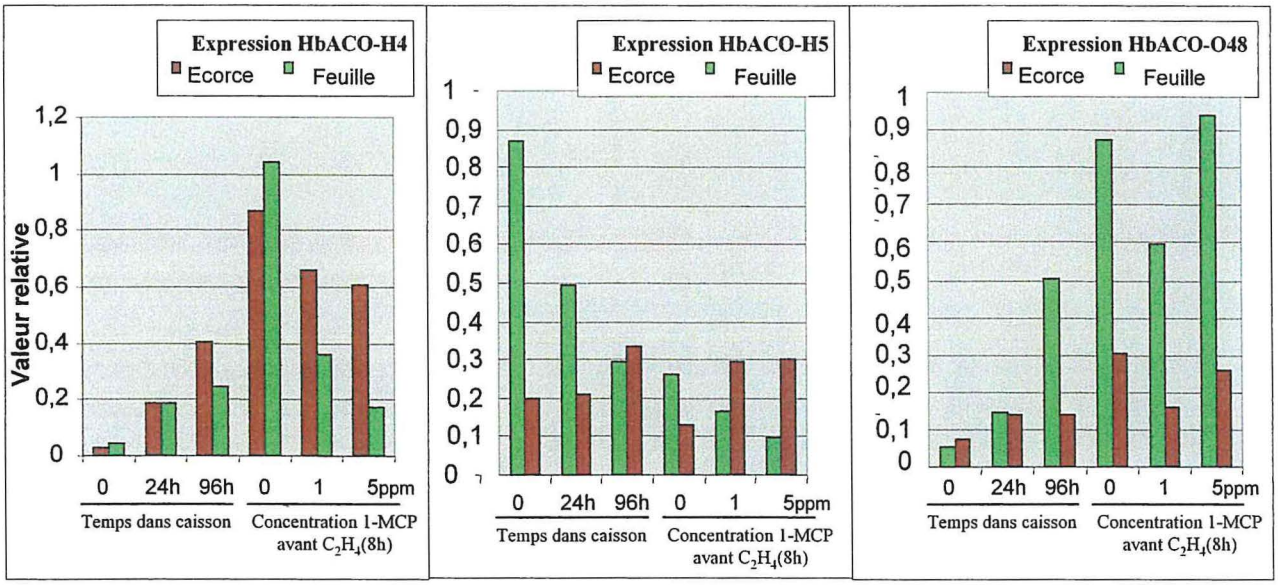

Figure 32. Effet du caisson et du pré-traitement au 1-MPC (1-méthylcyclopropène) avant la stimulation à l'éthylène sur l'expression des gènes *ACO* dans les écorces et les feuilles de jeunes plants greffés PB 260. Analyse par RT-PCR semi-quantitative.
(Chaque point représente le niveau d'expression dans une plante différente. Un plant non traité a été prélevé au temps 0 ; 2 autres plants ont été placés respectivement 24 et 48h dans un caisson étanche avant analyse ; 3 autres plants ont été placés dans un caisson, puis traités 16 h respectivement avec 0, 1 ou 5 ppm de 1- MCP, puis 8h avec 1 ppm d'éthylène. Les prélèvements d'écorce et de feuille sont réalisés dès la fin du traitement. Les conditions PCR utilisées sont : 94°C-3 min, 18 à 27 cycles (94°C-30 sec, 55°C-1 min, 72°C-1 min), 72°C-7 min. L'actine a subis 24 cycles d'amplification pour chacun des gènes. Pour H4, H5 et O48, l'amplification a été respectivement de 27, 27 et 18 cycles).

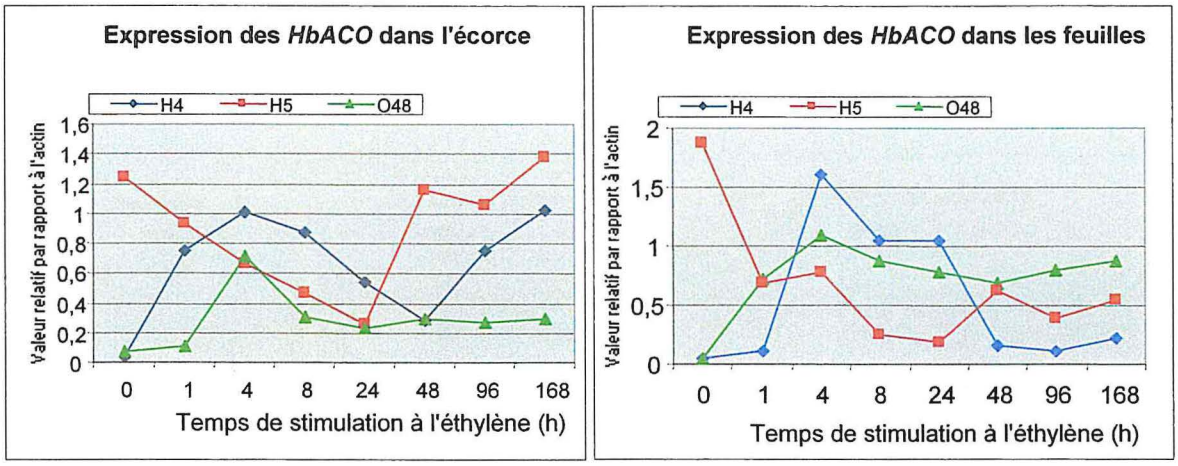

Figure 33. Effet de la stimulation à l'éthylène sur l'expression des gènes *ACO* dans les écorces et les feuilles de jeunes plants greffés PB 260. Analyse par RT-PCR semi-quantitative. (Chaque point représente le niveau d'expression dans une plante différente. Un plant non traité a été prélevé au temps 0, puis 7 autres plants ont été traités à l'éthylène (1 plant pour chacun de 7 points restant de la cinétique). Les prélèvements d'écorce et de feuille ont été effectués 1, 4, 8, 24, 48 96 et 168 h après traitement. Les conditions PCR utilisées sont : 94°C-3 min, 18 à 27 cycles (94°C-30 sec, 55°C-1 min, 72°C-1 min), 72°C-7 min. L'actine a subis 24 cycles d'amplification pour chacun des gènes. Pour H4, H5 et O48, l'amplification a été respectivement de 27, 27 et 18 cycles.-

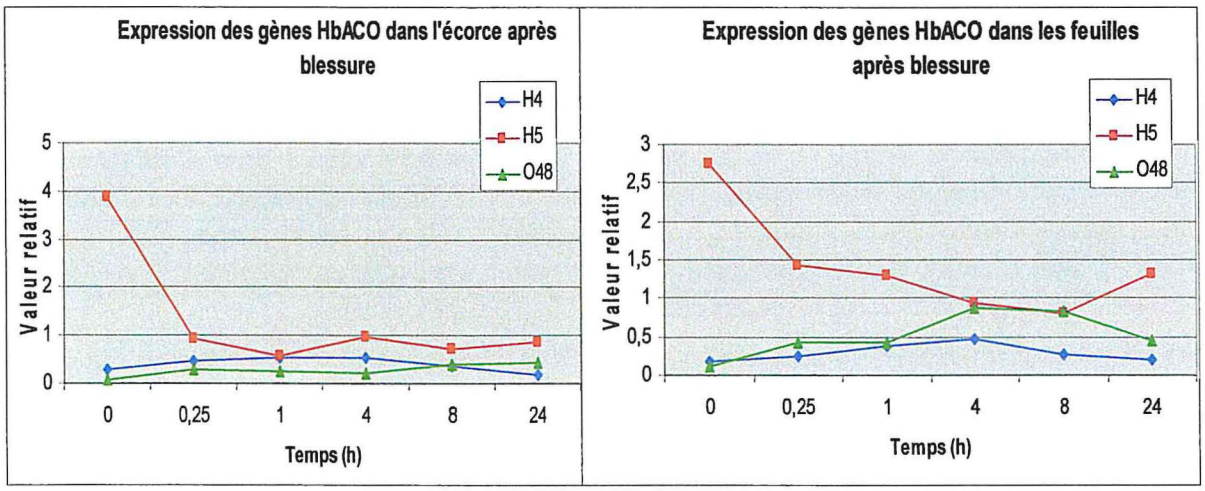

Figure 34. Effet de la blessure sur l'expression des gènes *ACO* dans les écorces et les feuilles de jeunes plants greffés PB 260. Analyse par RT-PCR semi-quantitative. (Chaque point représente le niveau d'expression dans une plante différente. Un plant non traité a été prélevé au temps 0, puis 7 autres plants ont été traités à l'éthylène (1 plant pour chacun de 7 points restant de la cinétique). Les prélèvements d'écorce et de feuille ont été effectués 15 min, puis à 1, 4, 8 et 24h après traitement. Les conditions PCR utilisées sont : 94°C-3 min, 18 à 27 cycles (94°C-30 sec, 55°C-1 min, 72°C-1 min), 72°C-7 min. L'actine a subis 24 cycles d'amplification pour chacun des gènes. Pour H4, H5 et O48, l'amplification a été respectivement de 27, 27 et 18 cycles).-

L'activité transcriptionnelle de *HbACO-H4* et *HbACO-O48* est stimulée par la blessure à la fois dans les écorces et les feuilles. Dans les feuilles, cette stimulation est plus marquée dès 15 minutes et atteint un maximum à 4 h pour ensuite décliner.

HbACOH5 est réprimé par la blessure. Cette régulation négative est très rapide dans les écorces puisque 15 minutes après blessure, il est estimé que l'expression de ce gène décline de 4 fois par rapport à sa valeur initiale. Dans les feuilles, la diminution est plus lente et nécessite 8 h. A 24h, on observe une reprise de l'accumulation des transcrits.

4.2.2. Localisation de l'expression des gènes *HbACO* par hybridation *in situ*

Les études sur la localisation de l'expression des gènes *HbACO* ont bénéficié des adaptations techniques à l'hévéa, et plus particulièrement aux tissus d'écorce (Guilhaumon, 2005; Marteaux, 2004; Vidal, 2003). Ces mises au point ont visé l'augmentation de la sensibilité de détection des gènes (faiblement exprimés dans les tissus étudiés) et de la spécificité des sondes (sondes courtes dans les régions 3' non codantes spécifiques de chacun des membres de la famille multigénique).

4.2.2.1. *Caractérisation de l'expression du gène HbACO-H5 dans les tissus de l'écorce de rejet et dans les tissus de différents organes de plantules somatiques*

Avec la révélation au NBT/BCIP, on observe, au niveau de l'écorce, que le gène *HbACO-H5* s'exprime dans le cortex et dans l'ensemble du phloème. S'agissant des plantules, les coupes de tous les organes, hybridées avec les sondes *HbACO-H5* antisens ou sens, présentent un marquage d'intensité hétérogène dans l'ensemble des tissus. En effet, les feuilles sont plus fortement marquées que les racines et les tiges pour le même temps de révélation. Après 8h de révélation pour les feuilles, un marquage aspécifique apparaît dans les chloroplastes et rend difficile l'observation d'un marquage. Pour les racines et les tiges, le temps de révélation optimal est supérieur à 24 h. Cependant, pour un temps de révélation aussi long, on observe également une précipitation du substrat responsable d'un important bruit de fond. Ainsi, il devient difficile de discriminer le marquage du bruit de fond. La localisation d'un signal spécifique du gène *HbACO-H5* dans les différents organes de plantules somatiques n'est pas satisfaisante dans les conditions déterminées pour les écorces.

En revanche, l'utilisation de la révélation par des anticorps marqués à l'Alexa488 permet de mieux caractériser l'expression de ce gène sur les deux types d'explants. On utilise les mêmes sondes *ACO-H5* de 400 pb marquées à la DIG que précédemment. Les coupes d'écorce hybridées avec la sonde *ACO-H5* antisens de 400 pb présentent un marquage cytoplasmique dans le parenchyme cortical (Figure 35 C) et le phloème (Figure 35 A) : ce marquage est même visible dans les laticifères (Figure 35 B). C'est un marquage précis car on note clairement qu'il se situe au niveau cytoplasmique. En revanche, les coupes hybridées avec la sonde sens ne montrent qu'un léger marquage aspécifique dans les parois et les analyses par déconvolution spectrale confirment ces résultats. Les tiges hybridées avec la sonde ACO-H5 antisens de 400 pb présentent un marquage cytoplasmique dans le cortex, la moelle et majoritairement dans le phloème dans la zone des laticifères (Figure 35 C et D). Ce marquage

est très précis. Les tiges hybridées avec la sonde sens présentent un léger marquage aspécifique dans les parois. Les racines hybridées avec la sonde ACO-H5 antisens de 400 pb présentent un très faible marquage cytoplasmique de quelques cellules du cortex et de la moelle tandis que celles hybridées avec la sonde sens ne montrent pas de marquage. Les feuilles hybridées avec la sonde ACO-H5 antisens ou sens de 400 pb présentent une forte autofluorescence des chloroplastes dans la zone d'émission d'Alexa488 (505-530 nm). La déconvolution spectrale ne permet pas de discriminer davantage le marquage de l'autofluorescence.

4.2.2.2. Caractérisation de l'expression du gène HbACO-04.8 dans les tissus de l'écorce de rejet et dans les tissus de différents organes de plantules somatiques

Pour étudier ce gène, on a synthétisé des sondes de 400 et 150 pb marquées à la DIG uniquement. Avec la révélation au NBT/BCIP, les coupes d'écorce hybridées avec les sondes antisens de 400 pb ne présentent pas de marquage après plus de 24h de révélation. Par contre, les coupes d'écorce hybridées avec les sondes antisens de 150 pb présentent un marquage important après seulement 5h de révélation et dans l'ensemble des tissus. Dans l'écorce l'expression de ce gène ressemble à celle observée pour ACO-H5. Pour les plantules, on retrouve les mêmes problèmes que ceux observés pour ACO-H5.

Pour la détection grâce aux anticorps fluorescents, on utilise les sondes de 150 pb marquées à la DIG qui avaient donné un résultat positif avec le système de révélation à la phosphatase alcaline. Les écorces hybridées avec la sonde antisens présentent un marquage cytoplasmique dans le parenchyme cortical et dans la zone des laticifères du phloème (Figure 35 E). De même, une légère autofluorescence naturelle des parois est toujours visible. Les tiges hybridées avec la sonde antisens présentent un marquage spécifique cytoplasmique dans le cortex, la moelle et surtout dans le phloème dans la zone des laticifères (Figure 35 F). Les tiges hybridées avec la sonde sens montrent un léger marquage sous forme de points fluorescents. Aucun signal spécifique n'est détecté dans les racines hybridées avec la sonde antisens ou sens. Les feuilles hybridées avec la sonde antisens ou sens présentent une forte autofluorescence des chloroplastes. La déconvolution spectrale ne permet pas non plus de discriminer le marquage spécifique de l'autofluorescence.

4.2.2.3. Caractérisation de l'expression du gène HbACO-H4 dans les tissus de l'écorce de rejet et dans les tissus de différents organes de plantules somatiques

Des sondes correspondant au gène *HbACO-H4* ont été synthétisées de la même façon que pour *HbACO-H5*. On dispose de sondes de 399 pb et 145 pb marquées à la DIG et au psoralène- biotine. L'utilisation de ces sondes sur différents organes de plantules somatiques et sur écorces de rejets n'a pas permis de mettre en évidence un marquage quel que soit la taille des sondes et le type de marquage.

4.2.2.4. Conclusion

L'utilisation de fluorochromes Alexa488 couplés à des anticorps permet donc d'amplifier le marquage spécifique et de localiser très finement l'expression des gènes *ACO*. Les gènes

HbACO-H5 et *HbACO-O4.8* s'expriment dans l'ensemble des tissus de l'écorce avec la même intensité. Dans les tiges, on observe une expression de ces gènes plus forte dans le phloème, et particulièrement dans la zone des laticifères, que dans les autres tissus. Dans les racines, l'expression de ces deux gènes est très faible voire inexistante. Dans les feuilles, l'autofluorescence est trop importante pour visualiser un marquage spécifique. Le fluorochrome Alexa488 n'est pas adapté dans ce cas. Pour le gène *HbACO-H4*, aucun marquage n'a pu être détecté.

Une synthèse des résultats d'expression de ces trois gènes est présentée Tableau 20. Elle permet de mettre en relation les résultats obtenus en hybridation moléculaire de type *Northern*, RT-PCR et hybridation *in situ*. Pour H5 et O48, on peut noter une bonne concordance des profils d'expression. La technique d'hybridation *in situ* reste toutefois non concluante pour les feuilles d'hévéa du fait des problèmes liés à la présence de pigments et de latex. Pour *HbACO-H4*, malgré une réitération des essais (nouvelles sonde et coupe cytologique) aucune expression n'a pu être observée dans les tissus.

Tableau 20. Comparaison des niveaux d'expression des gènes *ACO* obtenus par Northern, RT-PCR, HIS après 8h de stimulation éthylénique (Ethrel™ 2,5%). (NR) Non Réalisé, (ND) Non Détectable, (-) pas d'expression, (+)(++)(+++)(++++) intensité du signal.

Gènes	Matériel végétal		Northern	RT-PCR	Hybridation *in situ*	
					NBT-BCIP	Alexa488
ACO-H5	Greffé	Ecorce	+	++	Cortex : ++ Phloème : ++	Cortex : +++ Phloème : +++ Laticifères : +++
	Vitroplant	Tige	+++	NR	-	Cortex : +++ Phloème : ++++ Laticifères : ++++ Moelle : +++
		Racine	++	NR	-	Cortex : + Moelle : +
		Feuille	+++	NR	ND	ND
ACO-O48	Greffé	Ecorce	NR	++++	Cortex : +++ Phloème : +++	Cortex : +++ Phloème : +++ Laticifères : +++
	Vitroplant	Tige	NR	NR	ND	Cortex : +++ Phloème : ++++ Laticifères : ++++ Moelle : +++
		Racine	NR	NR	ND	-
		Feuille	NR	NR	ND	ND
ACO-H4	Greffé	Ecorce	+++	+++	-	-
	Vitroplant	Tige	++++	NR	ND	-
		Racine	+++	NR	ND	-
		Feuille	++++	NR	ND	ND

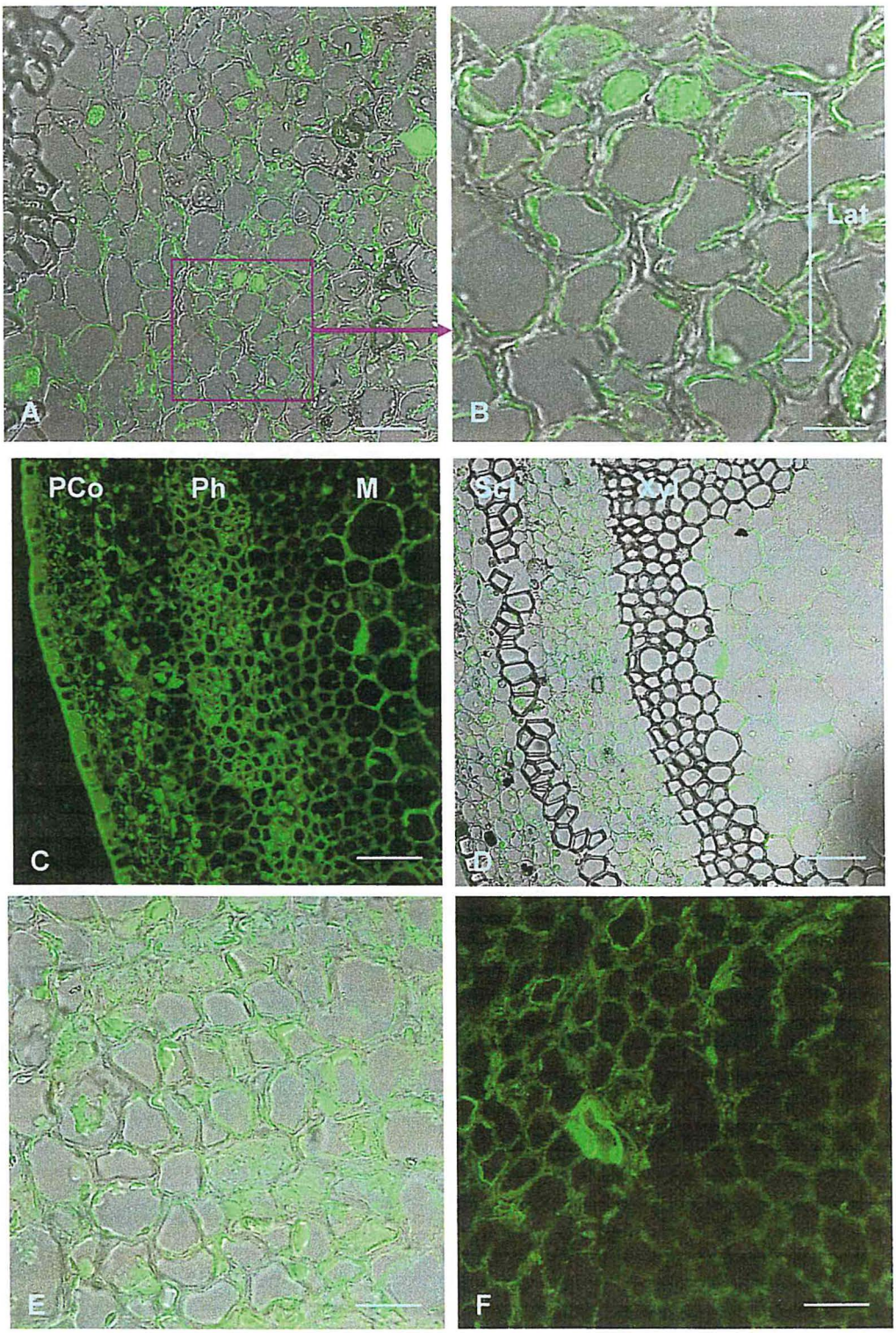

Figure 35. Hybridation *in situ* des ARNm d'*HbACO-H5 et HbACO-O4.8* sur des coupes transversales de l'écorce de rejet et de plantules somatiques.

A : Écorce hybridée avec la sonde ACO-H5 antisens en fluorescence et lumière blanche, phloème. Barre = 56 µm.
B : Écorce hybridée avec la sonde ACO-H5 antisens en fluorescence et lumière blanche, laticifères. Barre = 17µm.
C : Tige hybridée avec la sonde ACO-H5 antisens en fluorescence. Barre = 56 µm.
D : Tige hybridée avec la sonde ACO-H5 antisens en fluorescence et lumière blanche. Barre = 56 µm.
E : Écorce hybridée avec la sonde ACO-O4.8 antisens en fluorescence et lumière blanche, phloème. Barre = 27µm.
F : Déconvolution spectrale de tige hybridée avec la sonde ACO-O4.8 antisens. Barre = 27 µm.
PCo, Parenchyme cortical ; Scl, Sclérenchyme ; Ph, Phloème ; Xyl, Xylème ; M, Moëlle.

4.3. DISCUSSION ET CONCLUSION SUR LA CARACTERISATION DES GENES *ACO* CHEZ *H. BRASILIENSIS*

Le génome du clone PB 260 d'*Hevea brasiliensis* comporte au moins trois membres de la famille multigénique codant les ACO. Les séquences génomiques (H4 et H5) et les ADNc correspondants (*HbACO-H4, HbACO-H5, HbACO-O48*) ont été isolés. L'analyse des séquences montre que *HbACO-H5* et *HbACO*-H4/O48 constituent deux groupes phylogénétiques pouvant jouer des rôles différents *in planta*. Cela est appuyé par l'expression différentielle enregistrée en réponse à l'éthylène : la transcription des gènes *HbACO*-H4/O48 est activée transitoirement tandis que celle du gène *HbACO- H5* est réprimée.

Leur caractérisation à plusieurs stades de développement révèle une régulation différentielle de leur expression, *HbACO-H4* étant le gène le plus exprimé dans les écorces d'arbres exploités et répondant lui-même à la stimulation à l'Ethrel. Ces observations s'accordent bien avec le fait que l'application d'Ethrel provoque la production d'éthylène endogène *via* des réactions autocatalytiques (Siwei *et al.*, 1986; Sumarmadji, 1999). Ces résultats suggèrent aussi que l'isoforme ACO-H4 pourrait être le responsable majeur de la biosynthèse de l'éthylène endogène au niveau des tissus de l'écorce chez des arbres matures. Le très faible niveau d'expression observé dans le latex tend à montrer que le siège de la biosynthèse de l'éthylène serait dans les tissus de l'écorce environnant les cellules laticifères. Ces résultats apparemment en désaccord avec la localisation de l'expression de *HbACO-H5* et *HbACO-048* par la méthode d'hybridation *in situ* dans tous les tissus de jeunes plants greffés. En effet, à ce stade de développement, seul des laticifères primaires sont différenciés (comm. Pers. E. De Faÿ). Ces cellules n'ont pas pour origine le cambium. Les cellules laticifères secondaires sont à l'origine des manteaux laticifères et ne sont différenciées qu'à partir de la quatrième unité de croissance (Hao & Wu, 2000). On peut donc aisément imaginer qu'il y ait une régulation différentielle entre les cellules laticifères primaires présentes chez les vitroplants et les jeunes plants greffés et les tissus des stades de développement plus avancés comportant les laticifères secondaires. Cela ne permet pas de conclure sur le rôle spécifique de *ACO-H4* au niveau des écorces d'arbres exploités. Par contre, d'une manière générale les 3 gènes sont plus exprimés dans les différents organes de vitroplants âgés de 3 mois. Les études plus approfondies en cours devraient concourir à préciser le mode de fonctionnement de l'éthylène au cours du développement de l'hévéa en réponse à divers stress abiotiques.

La caractérisation de l'expression de ces gènes au niveau des jeunes plants greffés met en évidence une réponse négative (répression de *HbACO-H5*) et positive (sur-expression de *HbACO-H4* et *HbACO-O48*) à l'éthylène apporté soit sous forme d'Ethrel soit sous forme de gaz. D'une manière cohérente vis-à-vis de la diffusion plus rapide du gaz, l'éthylène agit plus rapidement au niveau des tissus. Les 3 gènes étudiés sont régulés de la même façon par la blessure mais avec une réponse encore plus rapide puisque dès 15 minutes après le traitement : on observe une réduction de la quantité de transcrits du gène *HbACO-H5* et une augmentation pour les deux autres gènes. Une étude plus approfondie des effets de la blessure à travers l'utilisation d'inhibiteur de la biosynthèse et de l'action de l'éthylène et du jasmonate devraient permettre de mieux comprendre le rôle spécifique de l'éthylène et de la blessure sur la régulation de la production d'éthylène (cf. Discussion générale).

Pour *HbACO-H4* et *HbACO-H5*, on observe une réponse sensiblement identique entre 1 et 5 ppm de 1-MCP. Ce résultat suggère que 1 ppm est suffisante pour bloquer l'action de 1 ppm

d'éthylène ; tous les récepteurs éthyléniques pourraient être saturés. Pour *HbACO-H4*, tout ou partie de l'activation de ce gène passerait par l'éthylène.

Pour *HbACO-H5*, le blocage de l'effet de l'éthylène par le 1-MCP permet de restaurer au-delà du niveau d'expression initial dans les écorces (0,3 contre 0,2 unité chez le contrôle). La régulation négative de l'expression de H5 semble donc en grande partie dépendante de l'éthylène. Par contre, au niveau des feuilles, nous observons une divergence entre la sur-expression significative observée avec l'Ethrel (exp. avec 3 répétitions indépendantes) et l'inhibition de l'expression observée par l'application d'éthylène dans 2 expériences indépendantes (cinétique et 1-MCP). L'effet de la blessure, ou plutôt le stress du touché, lors de l'application d'Ethrel ne peut pas être retenu puisque la blessure inhibe aussi l'expression de ce gène. Nous pourrions suggérer qu'il existe un autre effet de l'Ethrel ou bien des conditions de culture non contrôlées, qui ont provoqué une réponse positive au niveau des feuilles. Toutefois, l'inhibition de l'expression de H5 par le 1-MCP dans les feuilles suggère plutôt qu'il existe deux mécanismes de régulation de ce gène. Etant exprimé dans des conditions normales au niveau des feuilles, d'une part il serait inhibé directement par la blessure et l'éthylène, et d'autre part il existerait un autre niveau de régulation qui ferait intervenir indirectement l'éthylène.

Par contre pour *HbACO-048*, le léger phénomène d'inhibition de l'effet de l'éthylène par le 1-MCP sur l'activation transcriptionnelle de ce gène tend à conclure qu'il n'y a peu d'effet de l'éthylène sur son expression.

Dans le cadre de l'étude de la régulation par l'éthylène des mécanismes moléculaires impliqués dans la production du caoutchouc naturel, l'optimisation d'une méthode d'hybridation *in situ* a été envisagée chez *Hevea brasiliensis*. Des sondes spécifiques des 3 gènes *ACO* isolés ont été utilisées pour étudier l'expression différentielle de ces gènes dans différents tissus de plantules somatiques et d'écorce de rejets après une stimulation éthylénique de 8h. La caractérisation cellulaire fine de ces gènes, qui sont peu exprimés, a nécessité une amplification du marquage par utilisation d'anticorps couplés à des fluorochromes de type Alexa488. Cette méthode a permis de mettre en évidence une expression des gènes *HbACO-H5* et *HbACO-O4.8* dans tous les tissus d'écorce de rejets et de tiges, en particulier dans les cellules laticifères. Dans les tiges, on observe une expression de ces gènes plus forte dans le phloème, et particulièrement dans la zone des laticifères, que dans les autres tissus. Dans les racines, l'expression de ces deux gènes est très faible voire inexistante. Dans les feuilles, l'autofluorescence est trop importante pour localiser un marquage spécifique. Le fluorochrome Alexa488 n'est pas adapté dans ce cas.

Ces informations sur la régulation différentielle entre *HbACO-H5* et *HbACO-H4/O48*, nous permettent d'avancer que ces gènes auraient un rôle différent au niveau de la croissance, du développement et de la réponse au stress. Cette hypothèse est étayée notamment par le déclenchement de la dégradation de la chlorophylle et la sénescence des feuilles observées entre 48 et 168h après stimulation.

Les expériences utilisant un pré-traitement au 1-MCP tendent à démontrer la régulation spécifique de la transcription de *HbACO-H4* par l'éthylène. Par contre, l'expression du gène *HbACO-O48* stimulée lors d'application d'éthylène n'est pas uniquement dépendante de cette hormone, un phénomène de régulation plus complexe étant visiblement mis en jeu. Bien que les séquences de ces gènes soient fortement similaires (ils appartiennent au même sous-groupe d'après l'analyse phylogénétique), ils ont clairement une régulation différente.

La régulation du gène *ACO-H5* est encore plus complexe : l'expression de ce gène est régulée négativement à la fois par l'éthylène et le 1-MCP uniquement dans les écorces. Dans les feuilles, le 1-MCP tend à accentuer l'inhibition induite par l'éthylène.

Il existe donc des phénomènes de rétro-contrôle positif (auto-catalytique) et négatif (auto-inhibition) de ces gènes par l'éthylène.

L'effet de la blessure sur l'expression de 3 gènes étudiés est comparable à celle de l'éthylène mais d'une manière plus précoce (réponse dès 15 minutes après traitement). Ces trois gènes sont donc impliqués dans la réponse à la blessure. Cette réponse pourrait toutefois faire intervenir l'éthylène *via* une régulation de sa production par remobilisation de l'ACC et/ou de l'activité des enzymes de biosynthèse.

Des études sur l'analyse des promoteurs des gènes *HbACO* n'ont pas été menées car ils n'ont pas été isolés dans le cadre de ce travail. L'identification des boîtes de régulation de la séquence promotrice permettrait d'émettre des hypothèses sur les différents niveaux de régulation de ces gènes : hormonal (éthylène, ABA, jasmonate, auxine, etc.) ou facteurs environnementaux (lumière, blessure, etc.).

Par exemple, Blume et Grierson (1997) ont étudié l'expression du gène *ACO1* chez *Lycopersicum esculentum* et *Nicotiana plumbaginifolia* par des fusions promoteur-GUS (Blume & Grierson, 1997). Ils ont ainsi montré que l'expression du gène rapporteur était induite par la blessure, l'éthylène et l'infection par des agents pathogènes. L'ACC oxydase peut donc être régulé au niveau transcriptionnel par plusieurs stimuli externes. Dans un autre article, Blume et coll. décortiquent les régions promotrices et introniques de deux promoteurs de *LeACO* (Blume & Grierson, 1997). Ils y trouvent des insertions d'éléments mobiles de classe 1 et 2. La région en amont du gène *LeACO1* contient des séquences répétés directes de 420 pb qui sont présentes en copies multiples dans le génome de tomate d'une part, et qui sont similaires aux séquences promotrices des gènes *E4* et *2A11*. La région comportant les séquences répétées ressemble à des restes de rétrotransposon. Deux copies d'un élément transposable, appartenant à la famille des séquences inversées *Stowaway*, ont été trouvées dans la séquence flanquante en 5' et dans le troisième intron de *LeACO3*.

Au niveau de la régulation post-traductionnelle, l'analyse des séquences protéiques déduites des gènes *HbACOs* a permis d'observer que tous les motifs déterminants la fonctionnalité des enzymes étaient présents. A notre connaissance, il n'y a pas de véritables travaux démontrant l'influence de facteurs développementaux ou environnementaux sur la régulation de la stabilité ou de l'activité protéique. Par contre, nous devons souligner l'impact de la présence ou de l'absence du bicarbonate cytoplasmique sur l'activité de l'enzyme (Zhang *et al.*, 2004).

5. DISCUSSION GENERALE

5.1. GENES DE BIOSYNTHESE DE L'ETHYLENE CHEZ L'HEVEA

5.1.1. Plusieurs membres pour les familles multigéniques codant l'ACS et l'ACO chez *H. brasiliensis*

Les deux dernières étapes de la biosynthèse de l'éthylène sont assurées par des gènes codant l'ACC synthase et l'ACC oxydase. Ces gènes constituent des familles multigéniques respectivement composées de nombreux et de peu de membres. Chez *H. brasiliensis*, 5 gènes codant potentiellement 5 membres différents de la famille des ACS ont été caractérisés. Ces gènes sont les premiers isolés chez *H. brasiliensis*. Pour la famille *ACO*, un seul gène avait précédemment été isolé à partir d'une banque d'ADNc d'écorce (Accession Number NCBI AY207387.1) (Kongsawadworakul & Chrestin, 2004). L'isolement des séquences pleines longueurs chez le clone PB 260 de 3 membres de la famille des ACO apporte donc une contribution majeure aux connaissances chez *H. brasiliensis*. L'alignement de ces séquences avec celle du clone RRIM 600 montre une identité parfaite, malgré quelques différences très mineures, entre les séquences protéiques déduites HbACO-RRIM 600 et HbACO-H4 isolé chez le clone PB 260. Au niveau de leurs séquences nucléiques, le gène *HbACO-H4* est plus long en 5' de 33 pb tandis qu'il est plus court en 3' de 60 pb ; les parties internes à ces gènes est homologue à 100% sur les 1134 pb qui les constituent. Ces membres ont donc eu une parfaite conservation de leur séquence protéique au cours de leur évolution récente. En effet, les clones cultivés d'hévéa ont une base génétique étroite et sont issus d'une sélection clonale de familles de plein-frère propagés par greffage à partir de 1920 :

Clones	Parents (♀ x ♂)
PB 260	PB 5/51 x PB 49
PB 217	PB 5/51 x PB 6/9
RRIM 600	Tjir 1 x PB 86

Les différences de longueurs de leurs extrémités 5' et 3' non codantes, nous incite à poser la question du mode de mutation que ce gène à pu subir. Etant donné l'implication des séquences non codantes dans la régulation du gène, il serait intéressant de comparer les profils d'expression chez les clones PB 260 et RRIM 600. Dans tous les cas, on ne peut pas conclure sur le fait que *HbACO-RRIM 600* soit un autre membre de la famille des ACO.
Pour les gènes *ACS*, on trouve jusqu'à 13 membres chez *A.thaliana*, dont 11 fonctionnels, et 8 chez *L. esculentum*. Chez *H. brasiliensis*, des séquences partielles ou complètes de quatre membres potentiels ont été isolées. L'analyse moléculaire de type *Southern* ne nous permet pas de dire qu'il existe beaucoup de membres pour la famille des *HbACS* étant donné que 3 bandes sont hybridées au maximum pour les digestions par *Eco*RI et *Eco*RV. Les difficultés rencontrées pour l'isolement des membres de cette famille sont principalement dues à la fugacité de l'expression de ces gènes dont la probabilité d'être présent dans une banque d'ADNc ou une population d'ARN est relativement faible. Les connaissances apportées par ce travail au niveau des expressions géniques permettront de mieux cibler les traitements et les prélèvements à effectuer pour extraire des populations d'ARN enrichies en ces gènes. Un changement de stratégie de clonage est aussi proposé. L'analyse des séquences nucléiques *HbACS* ne permettant pas de définir des régions strictement homologues, on pourrait se baser

sur les régions peptidiques de *H. brasiliensis* les mieux conservées pour redéfinir des amorces dégénérées plus proches de *H. brasiliensis* que les précédentes, et ainsi amplifier des fragments génomiques.

Cette démarche a été employée pour le clonage du premier fragment partiel de la séquence de HbACO-048 avec succès.

Pour les *ACO*, les familles multigéniques ne dépassent généralement pas 5 membres. Récemment un 5ème membre a été découvert chez *L. esculentum* (Sell & Hehl, 2005). Ce dernier est induit en anaérobie et possède un domaine *leucine zipper* qui a permis son identification par criblage double hybride chez la levure. Trois membres ont été identifiés chez le tabac, et un seul chez *A. thaliana*. Chez *H. brasiliensis*, aux trois membres isolés pourrait se rajouter jusqu'à 4 autres gènes. En effet, l'analyse *Southern* indiquerait un groupe de gènes (jusqu'à 7 bandes pour les restrictions réalisées avec *Eco*RI et *Eco*RV). Ce nombre important d'ACO suggère que l'éthylène jouerait un rôle complexe chez *H. brasiliensis* et notamment à travers une modulation spatio-temporelle complexe de sa biosynthèse.

5.1.2. Proposition d'une classification des gènes *HbACS* et *HbACO*

Une tentative de classification fonctionnelle du gène *HbACS-D10* a été réalisée par la recherche du gène orthologue chez *Arabidopsis thaliana* et *Lycopersicum esculentum* pour lesquels on dispose des séquences protéiques complètes et validées sur la base de données SWISSPROT. Ce gène a pu être relié à la séquence *AtACS6*. Les premières informations sur l'expression de *HbACS-D10* montrent bien une réponse aux stimuli externes, comme pour *AtACS6*. Cependant, ce type de classification est délicat du fait que l'on ne dispose pas de données fonctionnelles complètes de la protéine candidate chez *H. brasiliensis*. Etant donné que ce gène est le premier isolé chez *H. brasiliensis*, nous proposons de nommer le gène *HbACS-D10* : *HbACS1* (numéro d'accession à déposer).

Pour la classification des HbACOs, la comparaison de séquence n'a pu être réalisée qu'avec trois des LeACO disponibles sur la base de données SWISSPROT. En effet, les séquences de deux autres ACO de tomate ne sont pas encore complètes ou validées. Des conclusions sur la classification fonctionnelle ne paraissent donc pas très sûres. Ayant isolé 3 ADNc pleines longueurs pour les *HbACOs*, une classification enzymatique basée sur la migration digitale des protéines à partir des séquences déduites a été choisie (Percheron *et al.*, 1991). Ces résultats permettent de classer les clones par ordre croissant : H5 (35278 g/mol), H4 (36033 g/mol) et 048 (36049 g/mol). Ainsi, nous proposons de nommer les clones HbACOs de la façon suivante :

Clones *H. brasiliensis*	Clones ADNc ou génomiques	Noms des protéines codées	Numéros d'accession
PB 260	HbACO-H5	HbACO1	A déposer
PB 260	HbACO-H4	HbACO2	A déposer
PB 260	HbACO-048	HbACO3	A déposer

5.2. REGULATION DE LA PRODUCTION D'ETHYLENE AU COURS DU DEVELOPPEMENT

L'éthylène est une hormone impliquée dans la régulation de la croissance et du développement des plantes. Son rôle est très étudié dans des processus particuliers tels que la maturation des fruits, la sénescence florale ou l'abscission, mais une part importante lui est accordée dans des processus normaux de croissance et de développement tels que la sortie de la dormance des graines, la croissance et la différenciation des tiges et des racines, l'induction de la floraison et l'ouverture de la fleur, la pollinisation ou encore la détermination du sexe (Reid, 1995). Cela implique donc une régulation spatio-temporelle au niveau des gènes de biosynthèse de l'éthylène mais cela fait aussi intervenir des voies de régulation de la transduction de son signal en interaction (communication) avec d'autres voies de signalisation hormonale.

Le rôle de l'éthylène en culture *in vitro* a été très étudié, et en particulier chez l'hévéa, on peut noter un effet de l'éthylène sur les processus de callogenèse et d'embryogenèse somatique (Auboiron *et al.*, 1990). Lors de l'initiation du processus d'embryogenèse somatique primaire, la production d'éthylène tend à favoriser le brunissement des cals et à inhiber le développement des structures embryogènes. L'inhibition de la synthèse d'éthylène par l'apport d'AOA (inhibiteur de l'ACC synthase) favorise la formation de cellules embryogènes. Ce n'est toutefois que l'apport d'$AgNO_3$, Ag^+ étant un inhibiteur des récepteurs éthyléniques, qui permet le développement des structures embryogènes en embryons somatiques. Contrairement, l'apport d'ACC, un précurseur de l'éthylène, favorise la sénescence des tissus. Les cals d'hévéa sont donc capables de produire de l'éthylène. Cecla est confirmé par l'observation de l'expression du gène *HbACS-D10* dans les cals 24 h après traitement lors des études présentées ici.

Par contre, l'absence d'expression des gènes *HbACO* révélée par analyse RT-PCR et par *Northern* dans les cals friables embryogènes est au premier abord surprenante. Cela pourrait s'expliquer soit par l'expression d'autres membres des familles multigéniques codant l'ACO dans les cals, soit par un état de stress moins important chez les cals analysés (cals friables établies en embryogenèse entretenue) par rapport à ceux étudiés par Auboiron (cals en cours de formation sur l'explant initial en embryogenèse primaire) pour lesquels le stress de découpe des explants et de mise en culture est très fort.

Au cours du développement des plants d'hévéa, l'*HbACS1 (D10)* est exprimée dans les tissus d'arbres matures à 8h et 24 h après traitement. Aucune expression de *HbACS1* n'a été observée dans les tissus juvéniles à 0 et 24h après stimulation. Cela pourrait être du au fait que l'expression de ce gène est transitoire. Les 3 gènes *HbACO* isolés montrent des profils d'expression différents entre-eux et évoluant. Ainsi, la forte réponse de *HbACO-H4* à la stimulation dans les écorces et les feuilles tend à s'amenuiser au cours de l'exploitation des arbres. Le gène *HbACO-O48,* comme *HbACO-H4,* répond à l'Ethrel par une surexpression. Dès le stade plant greffé, *HbACO-O48* s'exprime faiblement dans l'écorce et la stimulation éthylénique permet de revenir à un niveau d'expression de base. Le gène *HbACO-H5* quant à lui est inhibé par la stimulation éthylénique. Son expression tend à disparaître dans les arbres notamment ceux soumis au stress de saignée. Cela est cohérent avec le fait que la saignée induit la production d'éthylène endogène (Siwei *et al.*, 1986).

En conclusion, l'absence ou l'expression très faible dans les cals et le latex peut signifier qu'il existe d'autres membres dans la famille multigénique codant les ACO chez *H. brasiliensis* responsable de la production d'éthylène dans ces tissus. En effet, l'analyse moléculaire de type *Southern* tend à montrer qu'il existerait d'autres membres. L'hypothèse selon laquelle le latex ne serait pas un site de production d'éthylène et que cette production interviendrait dans d'autres tissus de l'écorce ne semble pas valide étant donné que la localisation de l'expression de H5 et O48 par hybridation *in situ* des ARNm montre la présence d'ARNm dans le latex.

Les tentatives de localisation de l'expression de *HbACO2 (H4)* n'ont pas abouti : aucune expression n'a été détecté quelques soient les tissus de l'écorce observé après stimulation éthylénique. Cela est en désaccord avec les analyses d'expression par RT-PCR. Toutefois nous rappelons que l'absence d'expression dans le latex de la *HbACO (RRIM 600)* peut supporter les difficultés d'observation de la *HbACO2 (H4)*.

5.3. LES PLANTS IMMATURES GREFFES, UN MODELE POUR ETUDIER LA REPONSE AUX STRESS ETHYLENIQUE ET BLESSURE

Les jeunes plants immatures greffés représentent un modèle pour l'étude des mécanismes de réponse aux stress éthylénique et à la blessure. L'étude de ces deux types de stress permet d'approcher d'une manière plus simple la régulation des mécanismes mis en jeu lors des stress d'exploitation que constituent la saignée et la stimulation par l'Ethrel. Bien entendu la saignée induit des phénomènes plus complexes que la seule blessure : l'écoulement du latex engendre aussi un stress osmotique et la régénération du cytoplasme un stress de réactivation métabolique.

La culture en serre ne permet pas le développement de plants au-delà de 4 à 5 unités de croissance (UC). Jusqu'à 4 UC, seuls les laticifères primaires sont observables dans les écorces : ils ne sont pas différenciés par le cambium contrairement aux laticifères secondaires qui sont à la base de la formation des manteaux laticifères (de Faÿ & Jacob, 1989; Hao & Wu, 2000; Vidal, 2003). Toutefois, nos précédents travaux nous ont permis d'identifier que ce stade de matériel végétal, le plant greffé avec **une unité de croissance**, possède une bonne stabilité dans l'expression génique d'une part et un grand nombre de gènes exprimés présents dans les laticifères d'arbres en exploitation d'autre part (Gramdi, 2006; Lefrançois, 2004).

Des études cytologiques et d'expression génique au cours de développement de l'hévéa ont été réalisées du stade cal embryogène à l'arbre mature exploité en passant par de jeunes vitroplants ou plants greffés (jeunes plants avec 1 à 4 unités de croissance ; arbres immatures non exploités). Les jeunes plants greffés présentent de nombreux avantages pour réaliser des études :
disponibilité du matériel végétal,
petite taille du plant greffé avec une unité de croissance,
niveau de différenciation tissulaire au niveau de l'écorce (présence de laticifères primaires),
possibilité d'appliquer différents traitements incluant des inhibiteurs métaboliques.

La réponse marquée à l'éthylène à ce stade de développement, et la reproductibilité des résultats permettent d'observer des phénomènes d'expression en cinétique. La significativité des expériences de stimulation à l'Ethrel, pour lesquelles 3 répétitions de 1 plant chacune sur

les 8 temps étudiés, font de ce matériel un outil indispensable pour décortiquer l'action de l'éthylène et de la blessure chez l'hévéa.

L'application des traitements gazeux a nécessité la construction d'enceintes de culture spécifiques à l'hévéa. Au-delà de 24 heures de traitement, ces caissons étanches au gaz provoquent un stress (température, hygrométrie, etc.) qui est surtout enregistré au niveau des feuilles. Ces modifications sont plus marquées au niveau des données physiologiques (Taly, 2006) que moléculaires (Gébelin, 2006).

Pour limiter ce stress dû au caisson, la construction de caissons plus grands avec des systèmes de régulation de la lumière, de la température, de l'hygrométrie et de la teneur en gaz peut être envisagée. Néanmoins, les résultats obtenus sur des cinétiques courtes de 24 heures sont tout à fait exploitables. La réponse moléculaire à l'Ethrel étant très comparable à celle à l'éthylène, l'utilisation autant que possible de ce traitement est préconisé si l'utilisation du 1-MCP n'est pas strictement nécessaire.

Enfin, le choix du clone pour cette étude s'est porté sur le PB 260 car ce clone est bien maîtrisé sur le plan des outils biotechnologiques (embryogenèse somatique et transgénèse), et il s'agit d'un clone à métabolisme actif intrinsèque qui répond à la stimulation éthylénique. Les premières applications d'Ethrel sont favorables à la qualité du latex. Par contre, l'application répétée d'Ethrel peut entraîner des encoches sèches. Au nord de Sumatra en Indonésie, l'application d'Ethrel est préconisée sur ce clone. Les bonnes conditions de pluies et la réduction des fréquences de saignées (D3 : tous les 3 jours) pourraient expliquer la meilleure résistance de ce clone aux conditions de stimulation.

5.4. REGULATION DE LA PRODUCTION D'ETHYLENE CHEZ DES PLANTS IMMATURES D'HEVEA EN REPONSE AUX STRESS

5.4.1. Les systèmes de production de l'éthylène chez l'hévéa

Il coexiste deux systèmes de production de l'éthylène chez les espèces végétales ainsi qu'une régulation de la sensibilité des tissus au niveau des récepteurs. Ces systèmes peuvent aussi être impliqués au niveau d'un même tissu, mais il existe une forte diversité de types de fonctionnement. Cela a été grandement décrit chez les fruits, du fait des applications importantes que cela entraîne.

La maturation des fruits climactériques est initiée par un premier pic de production d'éthylène dépendant du système 1, lequel est programmé génétiquement lors du développement. Un second pic d'éthylène intervient à une phase précise du développement du fruit (système I) amplifié par une production d'éthylène auto-catalytique (le système II) qui s'accompagne d'une crise respiratoire.

Les gènes *HbACS* et *HbACO* montrent bien une régulation différentielle au cours du développement et en réponse aux stress éthylénique et à la blessure. Les données d'expression de ces gènes chez les plantes immatures sont récapitulées dans le schéma de la Figure 36. Il existe une synergie entre la réponse à la fois à la blessure (réponse précoce en 15 min.) et à

l'éthylène (réponse plus tardive entre 4 et 8h) de l'***HbACS1*** **(D10)** et des ***HbACO2*** **(H4) et** ***HbACO3*** **(O48)**. Ces gènes pourront donc être impliqués dans une forme de **production auto-catalytique d'éthylène chez l'hévéa (système II)**. La concentration en ACC n'a pas tendance à s'accumuler sauf à 24 h après stimulation éthylénique dans les écorces et non dans les feuilles. Nous n'avons aucune preuve de la production d'éthylène liée à l'accumulation des ARNm de ces gènes. *HbACO1* (H5) est exprimé dans tous les tissus, bien que très faiblement dans les cals. Il est régulé négativement et transitoirement en réponse aux deux mêmes stress. Cela nous conduit à proposer qu'il existe une modulation de son expression par rétrocontrôle négatif Ainsi, ***HbACO1*** **(H5)** pourrait être rattaché au **système I** si la relation entre l'**expression basale et faible** de ce gène et la **production basale d'éthylène** était démontrée. La concentration endogène en éthylène n'est pas suffisante pour inhiber l'expression de *HbACO1* (H5). Ce n'est que lors d'un certain seuil critique d'éthylène, endogène ou exogène (1ppm dans le cadre de nos expériences), que *HbACO1* (H5) est véritablement inhibé.

L'inhibition de *HbACO1* (H5) est nettement compensée par la production de transcrits des deux autres membres lors de l'application des stress. Par contre, l'impact de cette régulation sur la production d'éthylène ne peut pas être déduit à ce stade. En effet, deux niveaux de régulation peuvent être considérés :

- en amont par les ACS qui gouvernent la production de l'ACC ;
- en aval aux niveaux post-transcriptionnel, traductionnel ou post-traductionnel des ACO qui modifieraient finalement l'activité ACO dans la cellule.

Environ 4 jours après la stimulation éthylénique, Ethrel ou éthylène gaz, un retour au niveau basal d'expression de *HbACO1* (*H5*) est observé. Dans le cas de l'Ethrel, on peut imaginer que la concentration tissulaire en éthylène issu de l'apport exogène dégagé par l'Ethrel et l'éthylène endogène produit fugacement par *HbACO2* (*H4*) et *HbACO3* (*048*) soit revenue à la normale. L'inhibition de *HbACO1* (*H5*) est alors annulée. Mais dans le cas de l'éthylène gaz, l'apport de 1 ppm est maintenu durant toute l'expérimentation. Une activation positive de ce gène par un autre facteur peut alors être proposée.

A ce stade après stimulation, une sénescence foliaire est visualisée. Elle est marquée par une dégradation de la chlorophylle, qui aboutit à une abscission foliaire au-delà de 7 jours. Cette réponse tissulaire pourrait provenir des perturbations métaboliques engendrées par l'éthylène produit de façon précoce, exogène et endogène. A souligner tout de même qu'il existe des cas d'expression concomitante de l'*ACO1* de melon avec la dégradation de la chlorophylle (Lasserre *et al.*, 1997). Le retour de l'expression de *HbACO1* (H5) pourrait accentuer les réponses cellulaires mis en place plus de façon plus précoce.

Les gènes *HbACO2* (H4) et *HbACO3* (O48) sont fort probablement responsables de la production d'éthylène en réponse aux stress chez les jeunes plants d'hévéa. Le suivi de leur régulation dans les arbres matures avant et au cours de leur exploitation sera donc très informatif pour comprendre leur rôle sur la production et le déclenchement de dysfonctionnement cellulaire. En particulier le gène *HbACO2* (H4) est bien exprimé et répond à l'application d'Ethrel dans les arbres matures. La démonstration en a été apportée par la présence des transcrits *HbACO3* (O48) lorsque les cycles d'amplification PCR ont été augmentés. De plus, la nature fugace de leur expression nécessitera une approche en cinétique pour identifier les stades les plus caractéristiques.

	ACS		ACO		
AdoMet	→	**ACC**	→		**Ethylène**
	ACS1		*ACO1, ACO2, ACO3*		
Feuille					
Ethrel	nd		-	+	-
C_2H_4	+		-	+	+
MCP + C_2H_4	-		-	-	-
Blessure	+		-	+	+
Ecorce					
Ethrel	nd		-	+	+
C_2H_4	+		-	+	+
MCP + C_2H_4	-		+	-	-
Blessure	+		-	+	+

Figure 36. Schéma récapitulatif des données d'expression des gènes *ACS* et *ACO* chez *Hevea brasiliensis*.

5.4.2. Régulation des gènes *ACS* en réponse aux stress

L'expression des gènes *ACS* est régulée par les stress biotiques et abiotiques.

Chez Arabidopsis, l'étude des promoteurs des gènes *AtACS4*,5,7 fusionnés au gène rapporteur *gusA* (Wang *et al.*, 2005) montre que :

AtACS4 répond aux hormones AIA, éthylène et ABA, ainsi qu'à la blessure et à l'obscurité ;
AtACS5 répond à l'AIA, l'ABA, au sel, les fortes températures et la blessure ;
AtACS7 répond à la GA_3, l'éthylène, l'ABA, l'obscurité et au sel.

Chez la tomate, l'expression des gènes *LeACS2,3,4,5,6,7* a été étudiée. Le gène *LeACS7* est exprimé transitoirement et de façon précoce en réponse à l'inondation des racines et à la blessure des feuilles, tandis que *LeACS2* a une expression spécifique dans les fruits blessés et n'est pas exprimé dans les feuilles blessées (Shiu *et al.*, 1998). Dans les suspensions cellulaires de tomate, les gène *LeACS2*,5,6 sont induit par des éliciteurs, tandis que *LeACS1B*, 3, 4 sont exprimés constitutivement, *LeACS3* étant à un niveau très fort et *LeACS1A* n'est pas détectable (Oetiker *et al.*, 1997).

5.4.3. Régulation des gènes *ACO* en réponse aux stress

Tous les promoteurs des gènes *ACO* sauf *PpACO1* possèdent au moins une copie d'un élément *cis* de réponse à l'éthylène (ERE, consensus AT/ATTCAA). Cela révèle bien la nature auto-catalytique de la synthèse de l'éthylène (Abeles *et al.*, 1992).

En ce qui concerne l'ACO1 de *Prunus persea,* Moon et Callahan (2004) ont mis en évidence la présence de nombreux autres sites potentiels de liaison à des facteurs de transcription dans le promoteur (Moon & Callahan, 2004).

Ces sites de liaison à des facteurs *trans* comprennent des motifs de liaison potentiel aux facteurs de transcription MADS box (régulation de la floraison) (Tilly *et al.*, 1998) ainsi que les éléments *cis* suivants :

- DRE/LTRE, à la sécheresse ou à des faibles températures (Baker *et al.*, 1994), (Dunn *et al.*, 1998) ;
- Saur, à l'auxine (Xu *et al.*, 1997) ;
- ACGT, répression par les sucres (Toyofuku *et al.*, 1998) ;
- 2S, régulation positive trouvé dans les gènes de protéines de stockage 2S (Stalberg *et al.*, 1996);
- AGC (consensus AGCCGCC), aux pathogènes (Ohme-Takagi *et al.*, 2000) ;
- DPBF, à l'ABA à travers la liaison à des facteurs de transcription ZIP (Kim *et al.*, 1997).

Les micro-ARNs (miRNAs) ont été récemment décrits comme des molécules de la classe des petits ARN (20-22 nucléotides) capables de jouer un rôle au niveau transcriptionnel. Ils sont produits par des transcrits précurseurs de 90-100 nucléotides de structure en épingle à cheveux (Kidner & Martiensen, 2003). Ils se lient aux ARNs qui possèdent une séquence complémentaire et régulent ainsi l'expression des gènes en modulant la stabilité des transcrits

ou bien la traduction des ARNm cibles. Les introns sont aussi connus pour être une source de micro-ARN intronique (Pattanayak *et al.*, 2005). Ces derniers ont un rôle au niveau post-transcriptionnel en déclenchant l'extinction de type *post-transcriptional gene silencing* (PTGS). L'analyse des séquences introniques des *HbACOs* pourrait révéler un tel niveau de régulation par micro-ARN.

Pout l'instant, aucune preuve pour un mécanisme de régulation post-transcriptionnel n'a été obtenue pour les gènes *ACO* d'hévéa. Par contre, un système post-traductionnel interviendrait plus tard. En effet, deux régions conservées correspondant à des sites d'autoclivage impliqués dans la dégradation des protéines ACO ont été trouvées. La correspondance entre les niveaux d'expression, la quantité de protéines et l'activité des ACO devra être étudiée afin de mieux comprendre les différents niveaux de régulation chez l'hévéa

5.5. INTERACTION ETHYLENE / BLESSURE SUR LA PRODUCTION D'ETHYLENE ET SA SIGNALISATION CHEZ L'HEVEA

La synergie des effets de l'éthylène et du jasmonate dans la réponse à la blessure est au cœur de la problématique de la saignée chez l'hévéa. Au cours de l'exploitation des hévéas, la saignée et l'éthéphon influencent la production d'éthylène endogène (Siwei *et al.*, 1986). L'étude de la réponse à l'éthylène ou à la blessure est bien entendu un phénomène bien plus complexe étant donné les interactions entre les différentes voies de signalisation hormonale (acide abscissique, auxine, cytokinine, éthylène, gibbérelline, acide jasmonique), pour revue : (Gazzarrini & McCourt, 2003; Wang *et al.*, 2002).

La réponse des plantes à la blessure est probablement un mécanisme de défense et de réparation des dégâts causés par les herbivores, les insectes ou les agents pathogènes (Leon *et al.*, 2001). La blessure induit généralement des éliciteurs qui sont des produits de dégradation des parois tels que l'oligogalacturonide (OGA) qui conduit à la formation de la systémine (peptide de 18 acides aminés) et puis à la biosynthèse du jasmonate. La signalisation jasmonate permet alors de synthétiser un marqueur moléculaire de la blessure de type PIN. PIN est un inhibiteur de protéinase. Sa synthèse est bloquée par l'acide acétyl salicylique (ASA) ou l'acide salicylique (SA) (O'Donnell *et al.*, 1996).

L'éthylène est bien connu pour activer l'action du jasmonate dans le cas de la réponse à la blessure (O'Donnell *et al.*, 1996). Inversement, le rôle de la blessure sur la biosynthèse de l'éthylène est bien décrit (Kende, 1993). La blessure provoque une induction de l'ACS et de l'ACO chez la plupart des espèces. Pour l'hévéa, cela se confirme avec une réponse à la blessure très rapide (<15 min.) et fugace de l'expression des gènes *HbACS* et *HbACO*. La réponse éthylénique intervient avec un décalage de plusieurs heures après le traitement (4-8 h).

Le blocage de l'action de l'éthylène par l'utilisation d'un prétraitement 1-MCP avant la blessure devrait nous aider aussi à mieux comprendre l'interaction entre ces deux voies de signalisation. Il a été confirmé que les éliciteurs de la blessure (OGA, Systémine, Jasmonate) sont capables d'induire la production d'éthylène. Cela est en accord avec nos observations sur l'induction de l'expression de *HbACS1 (D10), HbACO2 (H4)* et *HbACO3 (048)* par la blessure. Cette induction par la blessure peut être réprimée par un inhibiteur soit de la

synthèse soit de la signalisation jasmonate. Ainsi, nous pourrions envisager d'étudier les effets de tels inhibiteurs (ASA et SA). De plus, l'étude d'un marqueur spécifique de la voie blessure-jasmonate, tel que PIN-II devrait démontrer le rôle de la signalisation jasmonate dans la réponse à la blessure.

L'utilisation d'inhibiteurs de la biosynthèse de l'éthylène et de sa perception ainsi que l'étude de lignées transgéniques antisens-ACO ont permis de démontrer que la signalisation éthylène était nécessaire à l'induction du gène *PIN II* lors de la blessure de plants de tomate. Ce blocage de la réponse peut être de plus supprimé par l'application d'éthylène exogène. L'inhibition de la biosynthèse de l'éthylène réduit sensiblement l'accumulation de JA provoquée par la blessure. En effet, l'éthylène joue un rôle sur l'induction de l'allène oxyde synthase qui catalyse la première étape de la biosynthèse du jasmonate (Laudert & Welter, 1998; O'Donnell *et al.*, 1996; Sivasankar *et al.*, 2000).

Dans le cas de la blessure, les espèces activées d'oxygène ou *reactive oxygen species* (ROS) sont impliquées dans l'induction de l'ACS chez *Cucurbita maxima* (Watanabe & Sakai, 1998). En effet, une inhibition de la production de ROS par un inhibiteur de la NADPH oxydase de la membrane plasmique, le *diphenylene iodonium*, bloque la production d'éthylène mais pas celle du jasmonate.

6. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Cette thèse sur la régulation des gènes de biosynthèse de l'éthylène est la première étape des études conduites sur la caractérisation de l'impact des stress d'exploitation sur le fonctionnement du cambium et le métabolisme du système producteur de caoutchouc naturel.

Grâce à la validation du dispositif expérimental que représentent les plants immatures greffés, des perspectives d'approfondissement des connaissances sur la régulation de la production d'éthylène se présentent. Au niveau transcriptionnel, le clonage des promoteurs pourrait permettre une caractérisation fonctionnelle par transgénèse des séquences de régulation des gènes *ACS* et *ACO*. Une approche pharmacologique (effecteur/inhibiteur) est aussi possible du fait de l'application de traitements en conditions confinées et contrôlées sous forme de gaz (éthylène, 1-MCP) ou par application directe (éthéphon, blessure) sur les tissus. L'effet d'une courte exposition à l'éthylène devra être étudié aussi par opposition au traitement appliqué en continu dans ce travail. La propagation du stress blessure d'un organe à l'autre devra être aussi décortiquée et le rôle de l'éthylène dans la blessure précisé à l'aide d'inhibiteurs de biosynthèse et d'action des hormones impliquées.

Au-delà de la biosynthèse de l'éthylène se pose la question de la perception et de la transduction du signal éthylénique pour moduler la réponse à l'éthylène. Une des pistes de recherche, non développée dans cette thèse, est que la plante modifie sa perception de l'éthylène pour déjouer ou ajuster la réponse stricte en termes de production d'éthylène. L'effet de l'éthylène sur l'expression des gènes *ETR1* et *ERS1* codant des récepteurs éthyléniques chez *Citrus sinensis* a été démontré (Katz *et al.*, 2005). Cela ouvre donc une nouvelle piste de recherche pour appréhender les différences de réponse à la l'éthylène et la saignée chez l'hévéa. La disponibilité d'inhibiteurs à différents niveaux de la signalisation hormonale permettrait d'identifier les étapes clés de la régulation et de la communication hormonale. Cette approche visant la caractérisation de plants immatures greffés d'hévéa doit conduire à une meilleure compréhension de la réponse à l'éthylène dans les écorces d'arbres exploités. Chez ces plants matures, la production d'éthylène a été enregistrée (Siwei *et al.*, 1986; Sumarmadji, 1999), mais l'étude des mécanismes de réponse aux stress reste difficile à aborder. La conception d'un modèle sur la réponse aux stress sera un outil indispensable pour réaliser des validations ciblées chez des arbres en exploitation.

Une tentative de schématisation de l'influence de la stimulation éthylénique et de la blessure chez l'hévéa a été réalisée (Figure 37). L'éthylène stimule l'accumulation de transcrits des gènes *HbACS1*, *HbACO2* et *HbACO3*. Malgré l'absence d'accumulation d'ACC, plusieurs auteurs rapportent la production d'éthylène endogène après stimulation (Siwei *et al.*, 1986; Sumarmadji, 1999), Chrestin, comm. pers., IRD. S'appuyant sur le modèle de la voie de signalisation de l'éthylène, des facteurs de transcription coordonnent l'expression des gènes de réponse à l'éthylène impliqués dans la régulation des stress environnementaux et dans le développement de la plante. Chez l'hévéa, certains facteurs impliqués dans la réponse à l'éthéphon ont été caractérisés au niveau moléculaire et cellulaire : les facteurs coagulants et anti-coagulants localisés au niveau des lutoïdes (HEV, GLU, CHI) ou des particules de caoutchouc (IW3) ; la détoxication des espèces actives d'oxygène par les enzymes CuZnSOD, APX et CAT ; le métabolisme énergétique des nucléotides adényliques (PRS, APRT) ; et enfin, la biosynthèse du caoutchouc (FPPS, REF, HMGR, IPP, FDPS). Cela se traduit par l'amélioration de l'écoulement et de la régénération du latex dans les arbres en exploitation. Pour les jeunes plants greffés, ce stress déclenche la sénescence des feuilles.

La stimulation à l'éthylène influence l'expression de nombreux gènes à différents niveaux (tissus, organes, laticifères) chez *Hevea brasiliensis*. Par exemple, l'accumulation de transcrits du gène *HEV* survient après blessure ou application d'hormones (ABA, éthylène) dans les feuilles, les tiges et le latex mais pas dans les racines (Broekaert *et al.*, 1990). Le gène *HMG1* est induit par l'éthylène et son implication dans la biosynthèse de caoutchouc a été suggéré par (Chye *et al.*, 1992). Les transcrits du gène *MnSOD* sont accumulés de 3 à 5 fois en réponse à l'éthéphon (Miao & Gaynor, 1993). Pour le gène *HEVER*, on peut observer à la fois une augmentation des transcrits et des protéines après traitement à l'acide salicylique ou éthéphon (Sivasubramaniam *et al.*, 1995). Les gènes *GS* codant la glutamine synthétase sont aussi stimulés par l'éthéphon et cela se traduit par une augmentation de la quantité de protéines (Pujade-Renaud *et al.*, 1994).

L'étude de la réponse de clones à métabolismes contrastés, tels que le PB 260 et le PB 217, permettrait d'illustrer le comportement des plants en fonction de leur sensibilité à l'éthylène ou aux stress de façon générale. Les concentrations intra-laticifères en saccharose, phosphate inorganique et thiols sont des marqueurs du type métabolique des clones (Jacob *et al.*, 1989). Ainsi certains clones comme le PB 260 et le PB 217 ont des statuts physiologiques opposés (Gohet, 1996). Le premier est intrinsèquement très actif et ne nécessite pas de stimulation à l'éthéphon pour produire du latex. Le second a un métabolisme lent et requiert l'application régulière d'éthéphon. Vis-à-vis de leur teneur en saccharose, le PB 260 n'a pas de réserve : il consomme tout le saccharose qu'il dispose pour la biosynthèse de caoutchouc. Le PB 217 au contraire accumule du saccharose. L'étude de ces deux clones offre des perspectives intéressantes pour mieux comprendre le rôle de la stimulation éthylénique sur le statut physiologique et le contrôle de l'expression génique.

Le rôle de l'éthylène dans l'activation de la sénescence est relativement bien décrit. Chez l'hévéa, le dysfonctionnement des cellules laticifères est engendré par une fatigue physiologique (Jacob *et al.*, 1998). Cette fatigue entraîne un stress oxydatif *via* l'activation de la NADPH oxydase malgré une augmentation des activités peroxydases, de la catalase, SOD et des composés antioxydants (thiols). Les radicaux libres produits attaquent les membranes des lutoïdes qui libèrent les facteurs de coagulation : c'est l'encoche sèche de saignée par obturation des laticifères (Chrestin *et al.*, 1985). Ce phénomène reste réversible lorsque l'on stoppe l'exploitation des hévéas. Dans certains cas extrêmes, les tissus de l'écorce brunissent puis se nécrosent : c'est la nécrose corticale qui est engendrée par une sénescence profonde des tissus (Lacrotte *et al.*, 1997; Sookmark *et al.*, 2002; Sumarmadji, 1999). Une des réponses à l'éthylène est l'induction de gènes impliqués dans la sénescence. Par exemple, le gène LX codant une RNase est induit par l'éthylène et joue un rôle dans le catabolisme des ARN dans le stade final de la sénescence des feuilles de tomate (Lers *et al.*, 1998). Une meilleure compréhension de l'action de l'éthylène sur la régulation des gènes impliqués dans la sénescence est recherchée pour identifier des parades aux problèmes de perte de production liés au stress oxydatif et la sénescence des tissus.

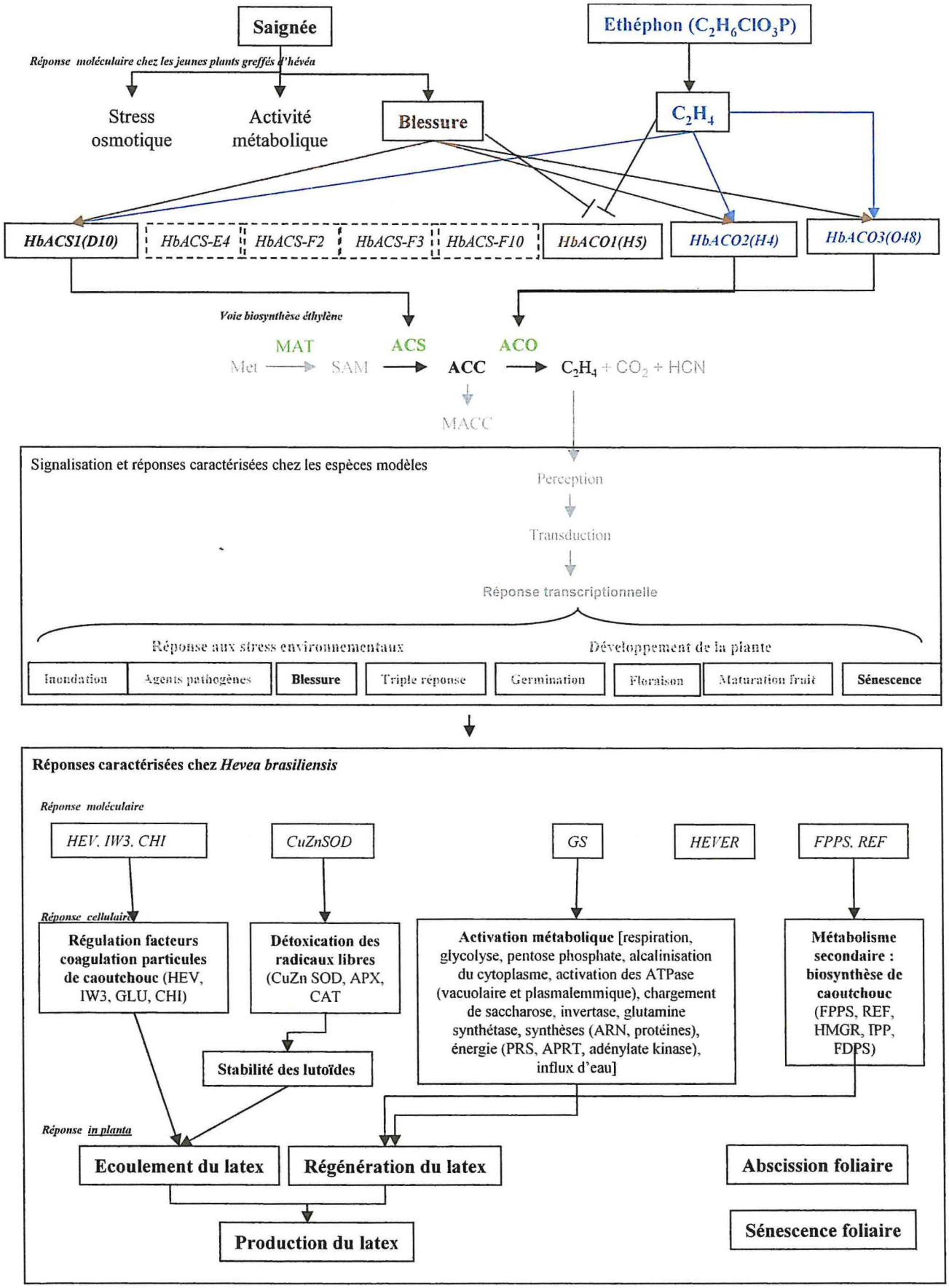

Figure 37. Modèle de travail présentant l'influence de la stimulation éthylénique et de la blessure sur la régulation de la biosynthèse d'éthylène et la réponse à l'éthylène au niveau moléculaire, cellulaire et *in planta* (écoulement et régénération du latex, abscission et sénescence foliaire) chez *Hevea brasiliensis*.

7. BIBLIOGRAPHIE

Abeles, F. B. (1966). Effect of ethylene on auxin transport. *Plant Physiol* **41**, 946-948.

Abeles, F. B., Morgan, P. W. & Salveit, M. E. (1992). *Ethylene in Plant Biology*. London, UK.: Academic Press.

Abraham, P. D., Wycherly, P. R. & Pakianathan, S. (1968a). Stimulation of latex flow in Hevea brasiliensis by 4-amino-3,5,6-trichloropicolinic acid and 2-chloroethane-phosphonic acid. *J. Rubb. Res. Inst. Malaya* **20**, 291-305.

Abraham, P. D., Boatman, S., Blackman, G. E. & Powell, R. G. (1968b). Effects of plant growthregulators and other compounds on flow of latex Hevea brasiliensis. *Annals of applied biology* **62**, 159-173.

Abraham, P. D., Blencowe, J. W., Chua, S. E., Gomez, J. B., Moir, G., Pakianathan, S., Sekhar, B. C., Southorn, W. A. & Wycherly, P. R. (1971). Novel stimulans and procedures in the exploitation of Hevea: I. Introductory Review. *J. Rubb. Res. Ins. Malaya* 23, 85-89.

Adam, Y. O. & Yang, S. F. (1979). Ethylene Biosynthesis : Identification of 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid as an immediate in the conversion of methionine to ethylene. *Proc. Natl Acad. Sci.* **76**, 170-174.

Alonso, J. M. & Stepanova, A. N. (2004). The ethylene signaling pathway. *Science* **306**, 1513-1515.

Andersson-Gunneras, S., Hellgren, J. M., Bjorklund, S., Regan, S., Moritz, T. & Sundberg, B. (2003). Asymmetric expression of a poplar ACC oxidase controls ethylene production during gravitational induction of tension wood. *Plant J* **34**, 339-349.

Andrews, E. H. & Dickenson, P. B. (1961). Observations préliminaires au microscope électronique sur l'ultra-structure des vaisseaux laticifères et du latex dans les tissus jeunes de l'Hevea brasiliensis. In *In : Revue Générale du Caoutchouc = ISSN 0370-503X. - (1961). - vol.38:n°399*, pp. p.397-402.

Apollo Arquiza, J. M., Hay, A. G., Nock, J. F. & Watkins, C. B. (2005). 1-Methylcyclopropene interactions with diphenylamine on diphenylamine degradation, alpha-farnesene and conjugated trienol concentrations, and polyphenol oxidase and peroxidase activities in apple fruit. *J Agric Food Chem* **53**, 7565-7570.

Argenta, L. C., Fan, X. & Mattheis, J. P. (2003). Influence of 1-methylcyclopropene on ripening, storage life, and volatile production by d'Anjou cv. pear fruit. *J Agric Food Chem* **51**, 3858-3864.

Arteca, J. M. & Arteca, R. N. (1999). A multi-responsive gene encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase (ACS6) in mature Arabidopsis leaves. *Plant Mol Biol* **39**, 209-219.

Auboiron, E., Carron, M. P. & Michaux-Ferrière, N. (1990). Influence of atmospheric gases, particularly ethylene, on somatic embryogenesi- s of Hevea brasiliensis. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* **21**, 31-37.

Baker, S. S., Wilhlem, K. S. & Thomashow, M. F. (1994). The 5'-region of Arabidopsis thaliana cor15a has cis-acting elements that confer cold-, drought- and ABA regulated gene expression. *Plant mol. biol.* **24**, 701-713.

Balague, C., Watson, C. F., Turner, A. J., Rouge, P., Picton, S., Pech, J. C. & Grierson, D. (1993). Isolation of a ripening and wound-induced cDNA from Cucumis melo L. encoding a protein with homology to the ethylene-forming enzyme. *Eur J Biochem* **212**, 27-34.

Banchi, Y. & Polliniere, J. P. (1969). Effects of minerals introduced directly into the wood and of acetylene applied to the bark of hevea. *J. Rubb. Res. Ins. Malaya* **21**, 192-206.

Baptist, E. D. C. (1955). Stimulation of yield in Hevea brasiliensis : 1. Pre-war experiment with vegetable oils. *J. Rubb. Res. Ins. Malaya* **14**, 355.

Baptist, E. D. C. & de Jonge, P. (1955). Stmulation of yield of Heva brasiliensis. 2. Effects of synthetic growth substances on yield and on bark renewal. *J. Rubb. Res. Ins. Malaya* **14**, 362-382.

Barry, C. S., Llop-Tous, M. I. & Grierson, D. (2000). The regulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase gene expression during the transition from system-1 to system-2 ethylene synthesis in tomato. *Plant Physiol* **123**, 979-986.

Barry, C. S., Blume, B., Bouzayen, M., Cooper, W., Hamilton, A. J. & Grierson, D. (1996). Differential expression of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase gene family of tomato. *Plant J* **9**, 525-535.

Beeley, F. & Baptist, E. D. C. (1939). Palm oil diluent for tar oil fungicides and its effects on bark renewal of Hevea. *J. Rubb. Res. Ins. Malaya* **9**, 40-50.

Bergey, D. R. & Ryan, C. A. (1999). Wound- and systemin-inducible calmodulin gene expression in tomato leaves. *Plant Mol Biol* **40**, 815-823.

Bergey, D. R., Howe, G. A. & Ryan, C. A. (1996). Polypeptide signaling for plant defensive genes exhibits analogies to defense signaling in animals. *PNAS* **93**, 12053-12058.

Bhowmik, P. K. & Matsui, T. (2005). Ethylene biosynthetic genes in 'Moso' bamboo shoot in response to wounding. *Postharvest Biology and Technology* **38**, 188-194.

Bleecker, A. B. & Kende, H. (2000). Ethylene: a gaseous signal molecule in plants. *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**, 1-18.

Blume, B. & Grierson, D. (1997). Expression of ACC oxidase promoter-GUS fusions in tomato and Nicotiana plumbaginifolia regulated by developmental and environmental stimuli. *Plant J* **12**, 731-746.

Boatman, S. G. (1966). Preliminary physiological studies on the promotion of latex flow by plant growth regulators. *J. Rubb. Res. Inst. Malaya* **19**, 243-258.

Boller, T., Herner, R. C. & Kende, H. (1979). Assay for and enzymatic formation of an ethylene precursor, 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. *Planta* **145**, 293-303.

Botella, J. R., Arteca, J. M., Schlagnhaufer, C. D., Arteca, R. N. & Phillips, A. T. (1992). Identification and characterization of a full-length cDNA encoding for an auxin-induced 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase from etiolated mung bean hypocotyl segments and expression of its mRNA in response to indole-3-acetic acid. *Plant Mol Biol* **20**, 425-436.

Botondi, R., DeSantis, D., Bellincontro, A., Vizovitis, K. & Mencarelli, F. (2003). Influence of ethylene inhibition by 1-methylcyclopropene on apricot quality, volatile production, and glycosidase activity of low- and high-aroma varieties of apricots. *J Agric Food Chem* **51**, 1189-1200.

Bouquin, T., Lasserre, E., Pradier, J., Pech, J. C. & Balague, C. (1997). Wound and ethylene induction of the ACC oxidase melon gene CM-ACO1 occurs via two direct and independent transduction pathways. *Plant Mol Biol* **35**, 1029-1035.

Bouzayen, M., Latche, A., Pech, J. C. & Alibert, G. (1987). Involvement of vacuoles in ethylene metabolism in plant cells. *NATO advance sci. Inst. series.* **134**, 449-454.

Bouzayen, M., Lache, A., Pech, J. C. & Marigo, G. (1989). Carrier-mediated uptake of 1-(malonylamino)cyclopropane-1-carboxylic acid in vacuola isolated from Catharanthus roseus cells. *Plant Physiol* **91**, 1317-1322.

Bradford, K. J. & Yang, S. F. (1980). Xylem transport of 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid, an ethylene precursor, in waterlogged tomato plants. *Plant Physiol* **65**, 322-326.

Broekaert, I., Lee, H. I., Kush, A., Chua, N. H. & Raikhel, N. (1990). Wound-induced accumulation of mRNA containing a hevein sequence in laticifers of rubber tree (Hevea brasiliensis). *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 7633-7637.

Budiman, A. F. S. (2005). Market prospect and Indonesian rubber production. In *National conference in Rubber Breeding*, pp. 13-20. Medan, Indonesia: Ind. Rubb. Res. Inst.

Butt, V. S. & Beevers, H. (1966). Intermediary metabolism and pathology. In *Plant Physiology*. Edited by F. C. Steward. New York: Academic Press.

Capitani, G., Tschopp, M., Eliot, A. C., Kirsch, J. F. & Grutter, M. G. (2005). Structure of ACC synthase inactivated by the mechanism-based inhibitor L-vinylglycine. *FEBS Lett* **579**, 2458-2462.

Capitani, G., Hohenester, E., Feng, L., Storici, P., Kirsch, J. F. & Jansonius, J. N. (1999). Structure of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase, a key enzyme in the biosynthesis of the plant hormone ethylene. *J Mol Biol* **294**, 745-756.

Chae, H. S. & Kieber, J. J. (2005). Eto Brute? Role of ACS turnover in regulating ethylene biosynthesis. *Trends Plant Sci* **10**, 291-296.

Chae, H. S., Faure, F. & Kieber, J. J. (2003). The eto1, eto2, and eto3 mutations and cytokinin treatment increase ethylene biosynthesis in Arabidopsis by increasing the stability of ACS protein. *Plant Cell* **15**, 545-559.

Chang, C. & Bleecker, A. B. (2004). Ethylene biology. More than a gas. *Plant Physiol* **136**, 2895-2899.

Chapman, G. W. (1951). Plant hormones and yield in Hevea brasiliensis. *J. Rubb. Res. Ins. Malaya* **19**, 167-176.

Chen, Y. F., Etheridge, N. & Schaller, G. E. (2005). Ethylene signal transduction. *Ann Bot (Lond)* **95**, 901-915.

Chong, F. C. (1981). The role of carbohydrate in the exploitation on latex flow of Hevea. *J. Rubb. Res. Ins. Malaya* **29**, 125-126.

Chrestin, H. & Bangratz, J. (1988). Adenine nucleotides and energy charge in the latex from Hevea brasiliensis, clonal characteristics, relations with yield and sensitivity towards bark-dryness, effects of yield stimulation with Ethrel. In *Colloquium on exploitation-physiology and improvement of Hevea*, pp. 547-562. Montpellier, France.

Chrestin, H., Jacob, J. L. & d'Auzac, J. (1985). Biochemical basis for the cessation of latex flow and occurrence of physiological bark dryness. In *Proc. Int. Rub. Conf.* Edited by e. Rubb. Res. Inst. Malaysia. Kuala Lumpur.

Chrestin, H., Bangratz, J., d'Auzac, J. & Jacob, J. L. (1984). Role of the lutoidic tonoplast in the senescence and degradation of the laticifers of *Hevea brasiliensis*. *Pflanzenphysiol* **Bd. 114-S**, 261-268.

Chrestin, H., Pujade-Renaud, V., Montoro, P., Narangajavana, J., Vichitcholchai, N., Teerawatanasuk, K. & R., L. (1997). Cloning and expression of genes involved in coagulation and regeneration of latex : clonal variation and effects of yield stimulation with ethrel. In *The Biochemical and Molecular Tools for Exploitation and Diagnostic and Rubber Tree Improvement.* Bangkok, Thailand.

Chye, M.-L., Tan, C.-T. & Chua, N.-H. (1992). Three genes encode 3-hydroxy-3-methyglutaryl-coenzyme A reductase in *Hevea brasiliensis*: *hmg1* and *hmg3* are differentially expressed. *Plant Mol Biol* **19**, 473-484.

Clark, D. G., Richards, C., Hilioti, Z., Lind-Iversen, S. & Brown, K. (1997). Effect of pollination on accumulation of ACC synthase and ACC oxidase transcripts, ethylene production and flower petal abscission in geranium (Pelargonium x hortorum L.H. Bailey). *Plant Mol Biol* **34**, 855-865.

Cockbain, E. G. & Southorn, W. A. (1962). Structure et composition du latex d'Hévéa. *Rev. Gén. Caout. Plast.* **39**, 1149-1156.

Compagnon, P. & Tixier, P. (1950). Sur une possibilité de ameliorer la production de'Hevea brasiliensis par l'apport d'oligo elements. *Rev Gén Caout Plast* **27**, 591-663.

Coupé, M., Lambert, C., Primot, L. & d'Auzac, J. (1977). Cinétique d'action de l'acide 2-chloro éthyl phosphonique (Ethrel) sur les polysomes du latex d'*Hevea brasiliensis*. *Phytochemistry* **16**, 1133-1136.

d'Auzac, J. (1989a). The hormonal stimulation of latex yield: historical account. In *Physiology of Rubber Tree Latex*, pp. 289-293. Edited by J. d'Auzac, J.-L. Jacob & H. Chrestin. Boca Raton, Florida: CRC Press Inc.

d'Auzac, J. (1989b). Historical account. pp. 289-294. Edited by J. D'Auzac, J. L. Jacob, H. Chrestin, , P. o. R. T. Latex, I. CRC Press & F. Boca Raton.

d'Auzac, J. & Jacob, J. L. (1969). Regulqtion of glycolysis in latex of Hevea brasiliensis. *J. Rubb. Res. Ins. Malaya* **21**, 417-444.

de Faÿ, E. & Jacob, J. L. (1989). Anatomical organization of the laticiferous system in the bark. In *Physiology of rubber tree latex*, pp. 4-14. Edited by J. d'Auzac, J. L. Jacob & H. Chrestin. Boca Raton (FL): CRC Press.

Destefano-Beltran, L. J., van Caeneghem, W., Gielen, J., Richard, L., van Montagu, M. & van der Straeten, D. (1995). Characterization of three members of the ACC synthase gene family in Solanum tuberosum L. *Mol Gen Genet* 246, 496-508.

Dijkman, M. J. (1951). Hevea : Thirthy years of research in the far east. Florida: Miami Press.

Do, Y. Y., Thay, T. S., Chang, T. W. & Huang, P. L. (2005). Molecular cloning and characterization of a novel 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase gene involved in ripening of banana fruits. *J Agric Food Chem* **53**, 8239-8247.

Dong, J. G., Fernandez-Maculet, J. C. & Yang, S. F. (1992). Purification and characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase from apple fruit. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 9789-9793.

Dunn, M. A., White, A. J., Vural, S. & Hughes, M. A. (1998). Identification of promoter elements in low temperature-responsive gene (blt4.9) from barley (Hordeum vulgare L.). *Plant mol. biol.* **38**, 551-564.

Ecker, J. R. (2004). Reentry of the Ethylene MPK6 module. *Plant Cell* **16**, 3169-3173.

Eschbach, J. M. & Banchi, Y. (1985). Advantages of Ethrel stimulationin association with reduced tapping intensity in Ivory Coast. *Planter's* **61**, 555-561.

Fan, L., Zheng, S. & Wang, X. (1997). Antisense suppression of phospholipase D alpha retards abscisic acid- and ethylene-promoted senescence of postharvest Arabidopsis leaves. *Plant Cell* **9**, 2183-2196.

Gallie, D. R. & Young, T. E. (2004). The ethylene biosynthetic and perception machinery is differentially expressed during endosperm and embryo development in maize. *Mol Genet Genomics* **271**, 267-281.

Gazzarrini, S. & McCourt, P. (2003). Cross-talk in plant hormone signalling: what Arabidopsis mutants are telling us. *Ann Bot (Lond)* **91**, 605-612.

Ge, L., Liu, J. Z., Wong, W. S., Hsiao, W. L. W., Chong, K., Xu, Z. K., Yang, S. F., Kung, S. D. & Li, N. (2000). Identification of a novel multiple environmental factor-responsive 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene, NT-ACS2, from tobacco. *Plant Cell Env* **23**, 1169-1182.

Gébelin, V. (2006). Expression of genes involved in tolerance to oxidative strees in Hevea brasiliensis in response to various treatments. In *Génomique et technologies avancées des plantes*, pp. 21. Montpellier: UM 2.

Gidrol, X., Chrestin, H., Tan, H. L. & Kush, A. (1994). Hevein, a lectin-like protein from Hevea brasiliensis (rubber tree) is involved in the coagulation of latex. *J Biol Chem* **269**, 9278-9283.

Gohet, E. (1996). La production de latex par Hevea brasiliensis. Relations avec la croissance. Influence de différents facteurs : origine clonale, stimulation hormonale, réserves hydrocarbonées. In *Thèse de Doctorat d'Université*, pp. 343 p.: Université de Montpellier 2.

Gomez, J. B. (1983). *Physiology of latex (Rubber) Production.* Kuala Lumpur, Malaysia: MRRDB.

Gomez, J. B. & Moir, G. F. J. (1979). The ultracytology of latex vessels in Hevea brasiliensis. Monograph N°4. In *Malaysian Rubber Research and Development Board, Rubb. Res. Inst. Malaysia, ed.* Kuala Lumpur.

Gramdi, S. (2006). Characterization of ethylene-responsive genes by Reverse Northern on clone PB 260 in Hevea brasiliensis. In *Génomique et technologies avancées des plantes*, pp. 17. Montpellier: CIRAD.

Guha, M. M., Guha, P. R., Mathew, J. & Guha, A. (1992). Hypodermic extraction of latex from Hevea brasiliensis. *Indian J. Nat. Rubb. Res.* **5**, 38-50.

Guilhaumon, C. (2005). Caractérisation de l'expression des gènes de biosynthèse de l'éthylène par hybridation in situ chez Hevea brasiliensis. Développement de techniques de localisation cellulaire de gènes faiblement exprimés. In *Génomique et technologies avancées des plantes*. Montpellier: UM2.

Hallé, F. & Martin, R. (1968). Etude de la croissance rythmique chez l'hévéa (Hevea brasiliensis Müll -Arg- Euphorbiacées-Crotonoïdées).

Hamilton, A. J., Bouzayen, M. & Grierson, D. (1991). Identification of a tomato gene for the ethylene-forming enzyme by expression in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 7434-7437.

Hanover, P., Brzozowska, J. & Lioret, C. (1976). Etude du mécanisme de la coagulation du latex d'*Hevea brasiliensis* (Kunth) Müll. Arg. I. Facteurs agissant sur la coagulation. *Physiol Veg* **14**, 677-693.

Hao, B.-Z. & Wu, J.-L. (2000). Laticifer Differentiation in Hevea brasiliensis: Induction by Exogenous Jasmonic Acid and Linolenic Acid. *Annals of Botany* **85**, 37-43.

Hashim, I. (1982). Exploitation method geard toward low labour inputs. In *Int. Rubb. Res. Dev. Board Exploitation specialist meeting*. Kottayam, India.

Hashim, I. (1989). Exploitation of Hevea: An Introduction. In *Training manual on tapping , tapping system and yield stimulation on Hevea*, pp. 1-24. Edited by J. H. Yusoff. Kuala Lumpur: RRIM.

Hébant, C. (1981). Ontogénie des laticifères du système primaire de Hevea brasiliensis, une etude ultra structurale et cytochimique. *Can. J. Bot.* **59**, 974-985.

Hébant, C., Devic, C. & De Fäy, E. (1981). Organisation fonctionnelle du tissu producteur de l'Hevea brasiliensis. In *In : Revue Générale des Caoutchoucs et Plastiques = ISSN 0035-3175. - (1981-10)vol.58:n°614*, pp. p.97-100.

Holdsworth, M. J., Schuch, W. & Grierson, D. (1987). Nucleotide sequence of an ethylene-related gene from tomato. *Nucleic Acids Res* **15**, 10600.

Huai, Q., Xia, Y., Chen, Y., Callahan, B., Li, N. & Ke, H. (2001). Crystal structures of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) synthase in complex with aminoethoxyvinylglycine and pyridoxal-5'-phosphate provide new insight into catalytic mechanisms. *J Biol Chem* **276**, 38210-38216.

Huang, P. L., Parks, J. E., Rottmann, W. H. & Theologis, A. (1991). Two genes encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in zucchini (Cucurbita pepo) are clustered and similar but differentially regulated. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 7021-7025.

Huang, P. L., Do, Y. Y., Huang, F. C., Thay, T. S. & Chang, T. W. (1997). Characterization and expression analysis of a banana gene encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase. *Biochem Mol Biol Int* **41**, 941-950.

Hyodo, H., Tanaka, K. & Yoshisaka, J. (1985). Induction of 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase in wounded mesocarp tissue of winter squash fruit and the effect of ethylene. *Plant Cell Physiol* **26**, 161-167.

Jacob, J. L., Prevot, J. C. & d'Auzac, J. (1983). Augmentation de la production de l'hévéa par l'éthylène. *Rev Gén Caout Plast* **60**, 87-89.

Jacob, J. L., d'Auzac, J., Prévôt, J. C. & Sérier, J. B. (1995). Une usine à caoutchouc naturel : l'hévéa. *La Recherche* 276.

Jacob, J. L., Prévôt, J. C., Eschbach, J. M., Lacrotte, R., Serres, E. & A., C.-V. (1988). Metabolism of laticiferous cell and yield of Hevea brasiliensis. In *Colloquium on exploitation-physiology and improvement of hevea*, pp. 217-230. Montpellier, France.

Jacob, J. L., Prévôt, J. C., Roussel, D., Lacrotte, R., Serres, E., d'Auzac, J., Eschbach, J. M. & Omont, H. (1989). Yield limiting factors, latex physiological parameters, latex diagnosis and clonal physiology. Physiology of rubber tree latex. In *Physiology of rubber tree latex*, pp. 345-603. Edited by J. d'Auzac, J. L. Jacob & H. Chrestin. CRC Press, Boca Raton.

Jacob, J.-L., Prévôt, J.-C., Lacote, R., Gohet, E., Clément, A., Gallois, R., Joët, T., Pujade-Renaud, V. & D'Auzac, J. (1998). Les mécanismes biologiques de la production de caoutchouc par *Hevea brasiliensis.* The biological mechanisms controlling Hevea brasiliensis rubber yield. In *In : Plantations, Recherche, Développement = ISSN 1254-7670. - (1998/01-02)vol.5:n°1*, pp. p.5-17.

Jakubowicz, M. (2002). Structure, catalytic activity and evolutionary relationships of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase, the key enzyme of ethylene synthesis in higher plants. *Acta Biochim Pol* **49**, 757-774.

Junaidi, U. & Kuswanhadi (1995). Effect of upward tapping (UT) on rubber production of recommended Hevea clone. *Indonesian J. Nat. Rubb. Res.* **13**, 109-112.

Katz, E., Riov, J., Weiss, D. & Goldschmidt, E. E. (2005). The climacteric-like behaviour of young, mature and wounded citrus leaves. *J Exp Bot* **56**, 1359-1367.

Kende, H. (1993). Ethylene bisynthesis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **44**, 283-307.

Kertowardjono, S., Sube, A., Taha Surida, N. M. & Tjasadihardja, A. (1976). Some influence of Ethrel stimulation on properties od natural rubber and latex. *Menara Perkebunan* **44**, 74-81.

Kidner, C. A. & Martiensen, R. A. (2003). Macro effects of microRNAs in plants. *Trends in genetics* **19**, 13-16.

Kim, S. Y., Chung, H. J. & Thomas, T. L. (1997). Isolation of a novel class of bZIP transcription factors that interact with ABA-responsive and embryo specification elements in Dc3 promoter using a modified yeast one-hybrid system. *Plant J.* **11**, 1237-1251.

Kim, Y. S., Choi, D., Lee, M. M., Lee, S. H. & Kim, W. T. (1998). Biotic and abiotic stress-related expression of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase gene family in Nicotiana glutinosa L. *Plant Cell Physiol* **39**, 565-573.

Klee, H. J. (2004). Ethylene signal transduction. Moving beyond Arabidopsis. *Plant Physiol* **135**, 660-667.

Knoester, M., Bol, J. F., van Loon, L. C. & Linthorst, H. J. (1995). Virus-induced gene expression for enzymes of ethylene biosynthesis in hypersensitively reacting tobacco. *Mol Plant Microbe Interact* **8**, 177-180.

Koeck, M., Hamilton, A. & Grierson, D. (1991). eth1, a gene involved in ethylene synthesis in tomato. *Plant Mol. Biol* **17**, 141-142.

Kongsawadworakul, P. & Chrestin, H. (2004). Cloning and characterization of a cDNA encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase from Hevea bark. Accession Number NCBI AY207387.1.

Lacrotte, R., Vichitcholchai, N., Chrestin, H., Pujade-Renaud, V., Kosaisawee, J., Srisarn, P., Narangajavana, J., Montoro, P. & Gidrol, X. (1997).Latex diagnostic and molecular markers of the Tapping Panel Dryness (TPD). In *The Biochemical and Molecular Tools for Exploitation and Diagnostic and Rubber Tree Improvement.* Bangkok, Thailand.

Lasserre, E., Bouquin, T., Hernandez, J. A., Bull, J., Pech, J. C. & Balague, C. (1996). Structure and expression of three genes encoding ACC oxidase homologs from melon (Cucumis melo L.). *Mol Gen Genet* **251**, 81-90.

Lasserre, E., Godard, F., Bouquin, T., Hernandez, J. A., Pech, J. C., Roby, D. & Balague, C. (1997). Differential activation of two ACC oxidase gene promoters from melon during plant development and in response to pathogen attack. *Mol Gen Genet* **256**, 211-222.

Laudert, D. & Welter, E. W. (1998). Allene oxide synthase: A major control point in Arabidopsis thaliana octadecanoid signalling. *Plant J.* **15**, 675-684.

Lay, V. J., Prescott, A. G., Thomas, P. G. & John, P. (1996). Heterologous expression and site-directed mutagenesis of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase from kiwi fruit. *Eur J Biochem* **242**, 228-234.

Lee, G.-C. & Huang, P.-L. (1995). Molecular cloning and analysis of the cDNA coding ethylene-forming enzyme in Phalaenopsis. *J. Chin. Soc. Hortic. Sci* **41**, 68-85.

Lee, S., Suh, S., Kim, S., Crain, R. C., Kwak, J. M., Nam, H. G. & Lee, Y. (1997). Systemic elevation of phosphatidic acid and lysophospholipid levels in wounded plants. *Plant J* **12**, 547-556.

Lefrançois, C. (2004). Construction d'une banque d'ADNc enrichie en gènes régulés par l'éthylène par Suppression Substractive Hybridization chez Hevea brasiliensis. Reims: CIRAD.

Leon, J., Rojo, E. & Sanchez-Serrano, J. J. (2001). Wound signalling in plants. *J Exp Bot* 52, 1-9.

Lers, A., Khalchitski, A., Lomaniec, E., Burd, S. & Green, P. J. (1998). Senescence-induced RNases in tomato. *Plant Mol Biol* 36, 439-449.

Li, Y., Feng, L. & Kirsch, J. F. (1997). Kinetic and spectroscopic investigations of wild-type and mutant forms of apple 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase. *Biochemistry* **36**, 15477-15488.

Liang, X., Shen, N. F. & Theologis, A. (1996). Li(+)-regulated 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene expression in Arabidopsis thaliana. *Plant J* **10**, 1027-1036.

Lincoln, J. E., Campbell, A. D., Oetiker, J., Rottmann, W. H., Oeller, P. W., Shen, N. F. & Theologis, A. (1993). LE-ACS4, a fruit ripening and wound-induced 1-

aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene of tomato (Lycopersicon esculentum). Expression in Escherichia coli, structural characterization, expression characteristics, and phylogenetic analysis. *J Biol Chem* **268**, 19422-19430.

Liu, J. H., Lee-Tamon, S. H. & Reid, D. M. (1997). Differential and wound-inducible expression of 1-aminocylopropane-1-carboxylate oxidase genes in sunflower seedlings. *Plant Mol Biol* **34**, 923-933.

Liu, Q., Zhou, G. Y. & Wen, C. K. (2004). Ethylene signal transduction in Arabidopsis. *Zhi Wu Sheng Li Yu Fen Zi Sheng Wu Xue Xue Bao* **30**, 241-250.

Liu, Y. & Zhang, S. (2004). Phosphorylation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase by MPK6, a stress-responsive mitogen-activated protein kinase, induces ethylene biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Cell* **16**, 3386-3399.

Lizada, M. C. & Yang, S. F. (1979). A simple and sensitive assay for 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. *Anal Biochem* **100**, 140-145.

Llop-Tous, I., Barry, C. S. & Grierson, D. (2000). Regulation of ethylene biosynthesis in response to pollination in tomato flowers. *Plant Physiol* **123**, 971-978.

Lopez-Gomez, R., Morales-Dominguez, F., Mendoza Alcazar, O. & Gomez-Lim, M. A. (2004). Identification of a genomic clone to ACC oxidase from papaya (Carica papaya L.) and expression studies. *J Agric Food Chem* **52**, 794-800.

Lowe, J. S. (1964). Copper sulphate as a yield stimulant for Hevea brasiliensis. 2. Techniques for application of copper sulphate. *J. Rubb. Res. Ins. Malaya* **18**, 261-268.

Lukman (1995). To increase yield of smallholder rubber by application of appropriate exploitation system. *Indonesian J. Nat. Rubb. Res.* **13**, 208-211.

Ma, N., Cai, L., Lu, W., Tan, H. & Gao, J. (2005). Exogenous ethylene influences flower opening of cut roses (Rosa hybrida) by regulating the genes encoding ethylene biosynthesis enzymes. *Sci China C Life Sci* **48**, 434-444.

MacDiarmid, C. W. B. & Gardner, R. C. (1993). A cDNA sequence from kiwifruit homologous to 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase. *Plant Physiol* **101**, 691-692.

Mainstone, B. J. & Tan, K. S. (1964). Copper sulphate as a yield stimulant for hevea brasiliensis. 1. Experimental stimulation of 1931 budded rubber with 2,4 D or 2,4,5-T in the present or absent of copper sulphate injection. *J. Rubb. Res. Ins. Malaya* **18**, 253-260.

Mansour, R., Latche, A., Vaillant, V., Pech, J. C. & Reid, M. S. (1986). Metabolism of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid in ripenig apple fruits. *Plant Physiol* **66**, 495-502.

Marteaux, B. (2004). Mise au point d'une technique d'hybridation in situ adaptées aux plantules et écorces d'Hevea brasiliensis. caractérisation de l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme laticifère. In *Université Montpellier 2*, pp. 22. Montpellier: CIRAD.

Martin, M. N., Cohen, J. D. & Saftner, R. A. (1995). A new 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid-conjugating activity in tomato fruit. *Plant Physiol* **109**, 917-926.

Martinez-Romero, D., Dupille, E., Guillen, F., Valverde, J. M., Serrano, M. & Valero, D. (2003). 1-methylcyclopropene increases storability and shelf life in climacteric and nonclimacteric plums. *J Agric Food Chem* **51**, 4680-4686.

Mathooko, F. M., Mwaniki, M. W., Nakatsuka, A., Shiomi, S., Kubo, Y., Inaba, A. & Nakamura, R. (1999). Expression characteristics of CS-ACS1, CS-ACS2 and CS-ACS3, three members of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene family in cucumber (Cucumis sativus L.) fruit under carbon dioxide stress. *Plant Cell Physiol* **40**, 164-172.

McCarthy, D. L., Capitani, G., Feng, L., Gruetter, M. G. & Kirsch, J. F. (2001). Glutamate 47 in 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase is a major specificity determinant. *Biochemistry* **40**, 12276-12284.

McCollum, G. & Betz, C. (2000). Direct Submission (ACC oxidase from wounded Citrus sinensis leaves). *Unpublished (Submitted (15-NOV-2000) USDA,ARS,USHRL, 2001 S. Rock Rd., Ft. Pierce, FL 34945, USA.*

McGarvey, D. J. & Christoffersen, R. E. (1992). Characterization and kinetic parameters of ethylene-forming enzyme from avocado fruit. *J Biol Chem* **267**, 5964-5967.

McKeon, T. A., Hoffman, N. E. & Yang, S. F. (1982). The effect of plant hormone pre-treatments on ethylene production and synthesis of 1-aminocycloprpane-1-carboxylic acid in water stress wheat leaves. *Planta* **155**, 437-443.

Mekhedov, S. I. & Kende, H. (1996). Submergence enhances expression of a gene encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase in deepwater rice. *Plant Cell Physiol* **37**, 531-537.

Miao, Z. & Gaynor, J. J. (1993). Molecular cloning, characterization and expression of Mn-superoxide dismutase from the rubber tree (Hevea brasiliensis). *Plant Molecular Biology* **23**, 267-277.

Moir, G. F. J. (1969). Latex metabolism. *J. Rubb. Res. Ins. Malaya* **21**, 407-416.

Moon, H. & Callahan, A. M. (2004). Developmental regulation of peach ACC oxidase promoter--GUS fusions in transgenic tomato fruits. *J Exp Bot* **55**, 1519-1528.

Nadeau, J. A., Zhang, X. S., Nair, H. & O'Neill, S. D. (1993). Temporal and spatial regulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase in the pollination-induced senescence of orchid flowers. *Plant Physiol* **103**, 31-39.

Nakano, R., Ogura, E., Kubo, Y. & Inaba, A. (2003). Ethylene Biosynthesis in Detached Young Persimmon Fruit Is Initiated in Calyx and Modulated by Water Loss from the Fruit. *Plant Physiol.* **131**, 276-286.

Nakatsuka, A., Murachi, S., Okunishi, H., Shiomi, S., Nakano, R., Kubo, Y. & Inaba, A. (1998). Differential expression and internal feedback regulation of 1-aminocyclopropane-1-

carboxylate synthase, 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase, and ethylene receptor genes in tomato fruit during development and ripening. *Plant Physiol* **118**, 1295-1305.

Narváez-Vásquez, J., Florin-Christensen, J. & Ryan, C. A. (1999). Positional specificity of a phospholipase A activity induced by wounding, systemin and oligosaccharide elicitors in tomato leaves. *The Plant Cell* **11**, 2249-2260.

Obouayeba, S. (2002).Détermination de la maturité physiologique de saignée: normes d'ouverture de Hevea brasiliensis: Université d'Abidjan, Côte d'Ivoire.

O'Donnell, P. J., Calvert, C., Atzorn, R., Wasternack, C., Leyser, H. M. O. & Bowles, D. J. (1996). Ethylene as a Signal Mediating the Wound Response of Tomato Plants. *Science* 274, 1914-1917.

Oetiker, J. H., Olson, D. C., Shiu, O. Y. & Yang, S. F. (1997). Differential induction of seven 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase genes by elicitor in suspension cultures of tomato (Lycopersicon esculentum). *Plant Mol Biol* **34**, 275-286.

Ohme-Takagi, M., Suzuki, K. & Shinshi, H. (2000). Regulation of ethylene induced transcription of defence genes. *Plant Cell Physiol.* **41**, 1189-1192.

Olson, D. C., Oetiker, J. H. & Yang, S. F. (1995). Analysis of LE-ACS3, a 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase gene expressed during flooding in the roots of tomato plants. *J Biol Chem* **270**, 14056-14061.

Olson, D. C., White, J. A., Edelman, L., Harkins, R. N. & Kende, H. (1991). Differential expression of two genes for 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in tomato fruits. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 5340-5344.

Orozco-Cardenas, M. & Ryan, C. A. (1999). Hydrogen peroxide is generated systemically in plant leaves by wounding and systemin via the octadecanoid pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 6553-6557.

Orozco-Cardenas, M. L., Narvaez-Vasquez, J. & Ryan, C. A. (2001). Hydrogen peroxide acts as a second messenger for the induction of defense genes in tomato plants in response to wounding, systemin, and methyl jasmonate. *Plant Cell* **13**, 179-191.

Paardekooper, E. C. (1989). Exploitation of rubber tree. In *Rubber*, pp. 349-414. Edited by C. C. W. a. W. J. Baulkwill. Essex: Longman sci. Tech.

Pattanayak, D., Agarwal, S., Sumathi, S., Chakrabarti, S. K., Naik, P. S. & Khurana, S. M. (2005). Small but mighty RNA-mediated interference in plants. *Indian J Exp Biol* 43, 7-24.

Pearce, G. & Ryan, C. A. (2003). Systemic Signaling in Tomato Plants for Defense against Herbivores: ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF THREE NOVEL DEFENSE-SIGNALING GLYCOPEPTIDE HORMONES CODED IN A SINGLE PRECURSOR GENE. *J. Biol. Chem.* **278**, 30044-30050.

Percheron, F., Perlès, R. & Foglietti, M. J. (1991). *Biochimie structurale et métabolique*. Paris.

Pujade-Renaud, V., Clement, A., Perrot-Rechenmann, C., Prevôt, J. C., Chrestin, H., Jacob, J. L. & Guern, J. (1994). Ethylene-induced increase in glutamine synthetase activity and mRNA levels in *Hevea brasiliensis* latex cells. *Plant Physiology* **105**.

Reid, M. S. (1995). Ethylene in plant growth, development and senescence. In *Plant hormones*, pp. 486-508. Edited by P. J. Davies. New York: Kluwer Academic Publishers.

Reid, M. S., Fujino, D. W., Hoffman, N. E. & Whitehead, C. S. (1984). 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC): The transmitted stimulus in pollinated flowers. *J Plant Growth Regul* **3**, 189-196.

Reilly, K., Bernal, D., Cortes, D., Gomez-Vasquez, R., Beeching, J. R. & Tohme, J. (2005). Knowledge and tools for the modulation of post-harvest physiological deterioration in cassava. *Biology and Biochemistry*.

Ribailler, D. (1972). Importance des lutoides dans l'ecoulement de latex: Action de la stimulation. *Rev Gén Caout Plast* **47**, 305-310.

Roach, P. L., Clifton, P. J., Hensgens, C. M., Shibata, N., Schofield, C. J., Hajdu, J. & Baldwin, J. E. (1997). Structure of isopenicillin N synthase complexed with substrate and the mechanism of penicillin formation. *Nature* **387**, 827-830.

Ross, G. S., Knighton, M. L. & Lay-Yee, M. (1992). An ethylene-related cDNA from ripening apples. *Plant Mol Biol* **19**, 231-238.

Rottmann, W. H., Peter, G. F., Oeller, P. W., Keller, J. A., Shen, N. F., Nagy, B. P., Taylor, L. P., Campbell, A. D. & Theologis, A. (1991). 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in tomato is encoded by a multigene family whose transcription is induced during fruit and floral senescence. *J Mol Biol* 222, 937-961.

RRIM (1993). Annual report. Kuala Lumpur: Rubber Research Institute of Malaysia.

Ryan, C. A. & Moura, D. S. (2002). Systemic wound signaling in plants: A new perception. *PNAS* **99**, 6519-6520.

Salanoubat, M., Lemcke, K., Rieger, M., Ansorge, W., Unseld, M., Fartmann, B., Valle, G., Blocker, H., Perez-Alonso, M., Obermaier, B., Delseny, M., Boutry, M., Grivell, L. A., Mache, R., Puigdomenech, P., De Simone, V., Choisne, N., Artiguenave, F., Robert, C., Brottier, P., Wincker, P., Cattolico, L., Weissenbach, J., Saurin, W., Quetier, F., Schafer, M., Muller-Auer, S., Gabel, C., Fuchs, M., Benes, V., Wurmbach, E., Drzonek, H., Erfle, H., Jordan, N., Bangert, S., Wiedelmann, R., Kranz, H., Voss, H., Holland, R., Brandt, P., Nyakatura, G., Vezzi, A., D'Angelo, M., Pallavicini, A., Toppo, S., Simionati, B., Conrad, A., Hornischer, K., Kauer, G., Lohnert, T. H., Nordsiek, G., Reichelt, J., Scharfe, M., Schon, O., Bargues, M., Terol, J., Climent, J., Navarro, P., Collado, C., Perez-Perez, A., Ottenwalder, B., Duchemin, D., Cooke, R., Laudie, M., Berger-Llauro, C., Purnelle, B., Masuy, D., de Haan, M., Maarse, A. C., Alcaraz, J. P., Cottet, A., Casacuberta, E., Monfort, A., Argiriou, A., flores, M., Liguori, R., Vitale, D., Mannhaupt, G., Haase, D., Schoof, H., Rudd, S., Zaccaria, P., Mewes, H. W., Mayer, K. F., Kaul, S., Town, C. D., Koo, H. L., Tallon, L. J., Jenkins, J., Rooney, T., Rizzo, M., Walts, A., Utterback, T., Fujii, C. Y., Shea, T. P., Creasy, T. H., Haas,

B., Maiti, R., Wu, D., Peterson, J., Van Aken, S., Pai, G., Militscher, J., Sellers, P., Gill, J. E., Feldblyum, T. V., Preuss, D., Lin, X., Nierman, W. C., Salzberg, S. L., White, O., Venter, J. C., Fraser, C. M., Kaneko, T., Nakamura, Y., Sato, S., Kato, T., Asamizu, E., Sasamoto, S., Kimura, T., Idesawa, K., Kawashima, K., Kishida, Y., Kiyokawa, C., Kohara, M., Matsumoto, M., Matsuno, A., Muraki, A., Nakayama, S., Nakazaki, N., Shinpo, S., Takeuchi, C., Wada, T., Watanabe, A., Yamada, M., Yasuda, M. & Tabata, S. (2000). Sequence and analysis of chromosome 3 of the plant Arabidopsis thaliana. *Nature* 408, 820-822.

Sato, T. & Theologis, A. (1989). Cloning the mRNA encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase, the key enzyme for ethylene biosynthesis in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 6621-6625.

Satoh, S. & Yang, S. F. (1989). Specificity of S-adenosyl-L-methionine in the inactivation and the labeling of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase isolated from tomato fruits. *Arch Biochem Biophys* **271**, 107-112.

Schaller, A. & Oecking, C. (1999). Modulation of plasma membrane H+-ATPase activity differentially activates wound and pathogen defense responses in tomato plants. *Plant Cell* **11**, 263-272.

Scheer, J. M. & Ryan, C. A., Jr. (2002). The systemin receptor SR160 from Lycopersicon peruvianum is a member of the LRR receptor kinase family. *PNAS* **99**, 9585-9590.

Sebastia, C. H., Hardin, S. C., Clouse, S. D., Kieber, J. J. & Huber, S. C. (2004). Identification of a new motif for CDPK phosphorylation in vitro that suggests ACC synthase may be a CDPK substrate. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **428**, 81-91.

Sell, S. & Hehl, R. (2005). A fifth member of the tomato 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) oxidase gene family harbours a leucine zipper and is anaerobically induced. *DNA Seq* **16**, 80-82.

Serres, E., Lacrotte, R., Prévôt, J. C., Clément, A., Commere, J. & Jacob, J. L. (1994). Metabolic aspects of latex regeneration in situ for three hevea clones. *Indian Journal of Natural Rubber Research* **7**, 79-88.

Sethuraj, M. R. & George, M. J. (1976). Multiple band application of ethephon to increase the drainage area and yield. In *Symp. Int. Rubb. Res. Dev. Board.* Bogor, Indonesia.

Shiu, O. Y., Oetiker, J. H., Yip, W. K. & Yang, S. F. (1998). The promoter of LE-ACS7, an early flooding-induced 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene of the tomato, is tagged by a Sol3 transposon. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 10334-10339.

Sisler, E. C. & Serek, M. (1999). Compounds controlling the ethylene receptor. *Bot Bull Acad Sin* **40**, 1-7.

Sivakumaran, S. & Hashim, I. (1985). Low frequency tapping system: Approach toward improved performance. In *Int. Rubb. Conf.*, pp. 317-337. Kuala Lumpur, Malaysia.

Sivakumaran, S., Chong, K. & Zarin, M. T. A. (1991). RRIMFLOW: A promising radical method of crop production in Hevea. *Planters Bull.* **208/9**, 81-91.

Sivakumaran, S., Chong, K., Nayagam, J. & Yong, H. W. (1995).RRIMFLOW short cut systems: Techniques to increase tapper and land productivity. In *RRIM Growers Conf.*, pp. 73-112. Kuala Lumpur, Malaysia.

Sivasankar, S., Sheldrick, B. & Rothstein, S. J. (2000). Expression of allene oxide synthase determines defense gene activation in tomato. *Plant Physiol.* **122**, 1335-1342.

Sivasubramaniam, S., Vanniasingham, V. M., Tan, C. T. & Chua, N. H. (1995). Characterisation of HEVER, a novel stress-induced gene from Hevea brasiliensis. *Plant Mol Biol* **29**, 173-178.

Siwei, F., Wannia, Y. & Shaoqiong, Y. (1986). Endogenous ehtylene formation in Hevea bark tissues through etephon induction. In *Proc. IRRDB Rubb. Physiol. Expl. Meeting*, pp. 59-67. SCATC, Hainan, China.

Sookmark, U., Pujade-Renaud, V., Chrestin, H., Lacote, R., Naiyanetr, C., Seguin, M., Romruensukharom, P. & Narangajavana, J. (2002). Characterization of polypeptides accumulated in the latex cytosol of rubber trees affected by the tapping panel dryness syndrome. *Plant Cell Physiol* 43, 1323-1333.

Spanu, P., Grosskopf, D. G., Felix, G. & Boller, T. (1994). The Apparent Turnover of 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate Synthase in Tomato Cells Is Regulated by Protein Phosphorylation and Dephosphorylation. *Plant Physiol* **106**, 529-535.

Stalberg, K., Ellerstom, M., Ezcurra, I., Ablov, S. & Rask, L. (1996). Disruption of an overlapping E-box/ABRE motif abolished high transcription of the napA storage-protein promoter in transgenic Brassica napus seeds. *Planta* **199**, 515-519.

Steed, C. L., Taylor, L. K. & Harrison, M. A. (2004). Red light regulation of ethylene biosynthesis and gravitropism in etiolated pea stems. *Plant Growth Regul* **43**, 117-125.

Stepanova, A. N. & Alonso, J. M. (2005). Arabidopsis ethylene signaling pathway. *Sci STKE* **2005**, cm4.

Stratmann, J. W. & Ryan, C. A. (1997). Myelin basic protein kinase activity in tomato leaves is induced systemically by wounding and increases in response to systemin and oligosaccharide elicitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 11085-11089.

Subramaniam, K., Abbo, S. & Ueng, P. P. (1996). Isolation of two differentially expressed wheat ACC synthase cDNAs and the characterization of one of their genes with root-predominant expression. *Plant Mol Biol* **31**, 1009-1020.

Subronto (1978). Correlation studies of latex flow characters and latex minerals content. In *IRRDB Symp.* Kuala Lumpur, Malaysia.

Sumarmadji (1999). Response of Physiological characters and Latex Production to Ethylene Stimulation On Several Rubber Tree Clones. In *Advisors: Sudirman Yahya, Achmad Surkati Abidin, Alex Hartana, Bambang Sapta Purwoko, and Siswanto*. Bogor.

Taly, F. (2006). Study of biochemical factors involved in tolerance to oxidative stress in Hevea brsiliensis in response to various stresses. In *Génomique et technologies avancées des plantes*, pp. 18. Montpellier: CIRAD.

Tang, X., Wang, H., Brandt, A. S. & Woodson, W. R. (1993). Organization and structure of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase gene family from Petunia hybrida. *Plant Mol Biol* **23**, 1151-1164.

Tarun, A. S., Lee, J. S. & Theologis, A. (1998). Random mutagenesis of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase: a key enzyme in ethylene biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 9796-9801.

Tatsuki, M. & Mori, H. (2001). Phosphorylation of tomato 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase, LE-ACS2, at the C-terminal region. *J Biol Chem* **276**, 28051-28057.

Taysum, D. H. (1961). Effect of ethylene oxide on the tapping of Hevea brasiliensis. *Nature* **191**, 1319-1320.

Thanh, D. K., Sivakumaran, S. & Wong, K. C. (1996). Long-term effect of tapping and stimulation frequency on yield performance of rubber clone GT1. *J. Nat. Rubb. Res.* **11**, 96-107.

Tilly, J. J., Allen, D. W. & Jack, T. (1998). The CArG boxes in the promoter of the Arabidopsis floral organ identity gene APETALA3 mediate divers regulatory effects. *Development* **125**, 1647-1657.

Tophof, S., Martinoia, E., Kaiser, G., Hartung, W. & Amrhein, N. (1989). Compartmentation and transport of 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid and N-malonyl-1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid in barley and wheat mesophyll cells and protoplasts. *Physiol Plant* **75**, 333-339.

Toyofuku, K., Umemura, T. & Yamaguchi, J. (1998). Promoter elements required for sugar expression of the RAmy3D gene for alphaamylase in Rice. *FEBS Letters* **428**, 275-280.

Tsuchisaka, A. & Theologis, A. (2004). Unique and overlapping expression patterns among the Arabidopsis 1-amino-cyclopropane-1-carboxylate synthase gene family members. *Plant Physiol* **136**, 2982-3000.

Tupy, J. (1973). The activity of the latex invertase and latex production of *Hevea brasiliensis*. *Physiol Vég* **11**, 633-641.

Tupy, J. (1984). Translocation, utiliztion and availability of sucrose for latex production in hevea. In *C.R. Coll. Expl. Physiol. Amél. Hévéa*, pp. 135-153. Montpellier, France: IRCA-CIRAD ed.

Tupy, J. & Primot, L. (1976). Control of carbohydrate metabolism by ethylene in latex vessels of Hevea brasiliensis in relation to rubber production. *Biologia Plantarum* **18**, 373-382.

Van der Straeten, D., Van Wiemeersch, L., Goodman, H. M. & Van Montagu, M. (1990). Cloning and sequence of two different cDNAs encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in tomato. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 4859-4863.

Van Der Straeten, D., Zhou, Z., Prinsen, E., Van Onckelen, H. A. & Van Montagu, M. C. (2001). A comparative molecular-physiological study of submergence response in lowland and deepwater rice. *Plant Physiol* **125**, 955-968.

Vidal, R. (2003). Mise en évidence de l'expression des gènes codant pour la b-glucuronidase et la glutamine synthétase dans des cals embryogènes d'hévéa. Etude anatomique des tiges d'hévéa en vue d'une caractérisation des gènes d'intérêt par hybridation *in situ*: Rapport de Maîtrise de sciences et techniques.

Vogel, J. P., Schuerman, P., Woeste, K., Brandstatter, I. & Kieber, J. J. (1998). Isolation and characterization of Arabidopsis mutants defective in the induction of ethylene biosynthesis by cytokinin. *Genetics* **149**, 417-427.

Wang, C. Y. & Adams, D. O. (1982). Chilling-induced ethylene production in cucumbers (Cucumis melo L.). *Plant Physiol* **69**, 424-427.

Wang, H. & Woodson, W. R. (1992). Nucleotide sequence of a cDNA encoding the ethylene-forming enzyme from petunia corollas. *Plant Physiol* **100**, 535-536.

Wang, K. L., Li, H. & Ecker, J. R. (2002). Ethylene biosynthesis and signaling networks. *Plant Cell* **14 Suppl**, S131-151.

Wang, K. L., Yoshida, H., Lurin, C. & Ecker, J. R. (2004). Regulation of ethylene gas biosynthesis by the Arabidopsis ETO1 protein. *Nature* **428**, 945-950.

Wang, N. N., Shih, M. C. & Li, N. (2005). The GUS reporter-aided analysis of the promoter activities of Arabidopsis ACC synthase genes AtACS4, AtACS5, and AtACS7 induced by hormones and stresses. *J Exp Bot* **56**, 909-920.

Wang, T. W. & Arteca, R. N. (1995). Identification and characterization of cDNAs encoding ethylene biosynthetic enzymes from Pelargonium x hortorum cv Snow Mass leaves. *Plant Physiol* **109**, 627-636.

Wang, Z. Z., Li, Y. R., Zhang, S. Z., Lin, J. F. & Guo, L. Q. (2003). [Cloning and sequencing of ACC oxidase gene from sugarcane]. *Yi Chuan Xue Bao* **30**, 62-69.

Watanabe, T. & Sakai, S. (1998). Effect of active oxigen species and methyl jasmonate on expression of the gene for a wound inducible 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in winter squash (Cucurbita maxima). *Planta*, 570-576.

White, M. F., Vasquez, J., Yang, S. F. & Kirsch, J. F. (1994). Expression of apple 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in Escherichia coli: kinetic characterization of wild-type and active-site mutant forms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 12428-12432.

Wi, S. J. & Park, K. Y. (2002). Antisense expression of carnation cDNA encoding ACC synthase or ACC oxidase enhances polyamine content and abiotic stress tolerance in transgenic tobacco plants. *Mol Cells* **13**, 209-220.

Wijaya, T. (2005). Agroclimate mapping for clone selecting in many regions. In *National Symposium on Rubber Breeding*, pp. 306-317. Medan, Indonesia: IRRI.

Woeste, K. E., Ye, C. & Kieber, J. J. (1999). Two Arabidopsis mutants that overproduce ethylene are affected in the posttranscriptional regulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase. *Plant Physiol* **119**, 521-530.

Wong, W. S., Ning, W., Xu, P. L., Kung, S. D., Yang, S. F. & Li, N. (1999). Identification of two chilling-regulated 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase genes from citrus (Citrus sinensis Osbeck) fruit. *Plant Mol Biol* **41**, 587-600.

Xu, N., Hagen, G. & Guilfoyle, T. (1997). Multiple auxin response modules in the soybean SAUR 15A promoter. *Plant Sci.* **126**, 193-201.

Yamagami, T., Tsuchisaka, A., Yamada, K., Haddon, W. F., Harden, L. A. & Theologis, A. (2003). Biochemical diversity among the 1-amino-cyclopropane-1-carboxylate synthase isozymes encoded by the Arabidopsis gene family. *J Biol Chem* **278**, 49102-49112.

Yang, C. Y., Chu, F. H., Wang, Y. T., Chen, Y. T., Yang, S. F. & Shaw, J. F. (2003). Novel broccoli 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase gene (Bo-ACO3) associated with the late stage of postharvest floret senescence. *J Agric Food Chem* **51**, 2569-2575.

Yang, S. F. & Hoffman, N. E. (1984). Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **35**, 155-189.

Yang, S. F., Yip, W. K. & Dong, J. G. (1990a). Mechanism and regulation of ethylene biosynthesis. In, polyamine and ethylene : Biochemistry, physiology, and interactions, Florest, H.E. et al. (Eds). *Amer Soc Plant physiol*, 24-35.

Yang, S. F., Yip, W. K., Satoh, S., Miyazaki, J. H., Jiao, X., Liu, Y., Su, L. Y. & Peiser, G. D. (1990b). Metabolic aspect od ethylene biosynthesis. In *Plant growth substances*, pp. 291-299. Edited by R. P. Pharis & S. B. Road. Berlin: Springler-Verlag.

Yip, W. K., Dong, J. G., Kenny, J. W., Thompson, G. A. & Yang, S. F. (1990). Characterization and sequencing of the active site of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 7930-7934.

Yoon, I. S., Mori, H., Kim, J. H., Kang, B. G. & Imaseki, H. (1997). VR-ACS6 is an auxin-inducible 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene in mungbean (Vigna radiata). *Plant Cell Physiol* **38**, 217-224.

Yoshida, H., Nagata, M., Saito, K., Wang, K. L. & Ecker, J. R. (2005). Arabidopsis ETO1 specifically interacts with and negatively regulates type 2 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthases. *BMC Plant Biol* **5**, 14.

Yu, Y. B. & Yang, S. F. (1980). Biosynthesis of wound ethylene. *Plant Physiol* **66**, 281-285.

Yu, Y. B., Adams, D. O. & Yang, S. F. (1979). 1-Aminocyclopropanecarboxylate synthase, a key enzyme in ethylene biosynthesis. *Arch Biochem Biophys* **198**, 280-286.

Zanetti, M. E., Terrile, M. C., Arce, D., Godoy, A. V., Segundo, B. S. & Casalongue, C. (2002). Isolation and characterization of a potato cDNA corresponding to a 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) oxidase gene differentially activated by stress. *J Exp Bot* **53**, 2455-2457.

Zarembinski, T. I. & Theologis, A. (1993). Anaerobiosis and plant growth hormones induce two genes encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in rice (Oryza sativa L.). *Mol Biol Cell* **4**, 363-373.

Zhang, Z., Ren, J. S., Clifton, I. J. & Schofield, C. J. (2004). Crystal structure and mechanistic implications of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase--the ethylene-forming enzyme. *Chem Biol* **11**, 1383-1394.

Zhou, H., Wang, H. W., Zhu, K., Sui, S. F., Xu, P., Yang, S. F. & Li, N. (1999). The multiple roles of conserved arginine 286 of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase. Coenzyme binding, substrate binding, and beyond. *Plant Physiol* **121**, 913-919.

TITLE

Isolating and characterisation of genes encoding ACC synthase and ACC oxidase involved in ethylene biosynthesis in *Hevea brasiliensis*

ABSTRACT

Ethylene is a major stimulating factor of natural rubber production in *Hevea brasiliensis*. Ethylene biosynthesis in higher plants is catalyzed by ACC synthase and ACC oxidase. These enzymes are encoded by small multi family genes in many species and their expression is tightly controlled by developmental cues and in response to external environmental factors, growth substance treatments, pathogen attack and wounding. The application of ethephon, an ethylene releaser, onto the tapping panel of rubber tree is practised to enhance latex flow and its regeneration between two tappings. In some cases, this activation can stop the latex flow by favouring rubber particle coagulation: this is a phenomenon known as tapping panel dryness. In order to improve our understanding of this problem, the effect of exogenous ethylene and wounding on endogenous ethylene biosynthesis was investigated.

In this study, 3 full length of cDNA encoding ACC oxidases in *Hevea brasilensis,* (*HbACO1-HbACO2, HbACO3*), and one full length of cDNA encoding an ACC synthase, *HbACS1* were isolated. The *HbACOs* are respectively 1115, 1183 and 1348 bp, with open reading frames (ORF) encoding polypeptides of 312, 318 and 318 amino acids respectively. The genomic structure of *HbACO1* was different from *HbACO2*. *HbACO1* consists of 1456 bp has three introns and four exons, while *HbACO2* (1418 bp) has two introns and three exons. The genomic structure of *HbACO3* has yet to be characterised. The 1932 bp *HbACS1* cDNA contains an ORF encoding a polypeptide of 480 amino acids. *HbACS1* consists of three introns and four exons.

All of the *HbACO* genes were expressed at all stages of development in the plant, from the callus to the exploited plant, but with different expression profiles. It appears that *HbACO1* is expressed at higher level than the other genes, and decreases its expression following ethylene treatment and upon wounding in both the leaf and bark. *HbACO2* and *HbACO3* were transiently induced in response to ethylene treatment and wounding. Treatment with 1-MCP, an ethylene action inhibitor, abolished the ethylene induction of *HbACO2* expression, showing that this gene was under positive feedback regulation. The expression of *HbACS1* was also induced by ethylene treatment and wounding, again with an antagonist effect of 1-MCP.

In conclusion, *HbACO1* is apparently expressed for basal levels of ethylene biosynthesis and might be regulated by developmental cues, while *HbACO2* and *HbACO3* appear to be expressed in response to external factors. *HbACS1* is also induced by external factors. A working model for the possible roles of these genes in relation to endogenous ethylene biosynthesis and latex synthesis is presented.

KEYWORDS

Hevea brasiliensis, ACC synthase, ACC oxidase, 1-MCP, ethylene, wounding

RESUME

L'éthylène joue un rôle majeur dans la stimulation de la production du caoutchouc naturel chez *Hevea brasiliensis*. La biosynthèse de l'éthylène est catalysée par l'ACC synthase et l'ACC oxydase chez les plantes. Ces enzymes sont codées par des familles multigéniques chez beaucoup d'espèces végétales. Leurs expressions sont régulées par des signaux développementaux, en réponse à des facteurs environnementaux, des régulateurs de croissance, l'attaque d'agents pathogènes ou la blessure. L'application d'éthéphon, un générateur d'éthylène, sur le panneau de saignée de l'hévéa est pratiquée depuis longtemps pour prolonger l'écoulement et activer la régénération du latex entre deux saignées. Dans certains cas, cette activation, si trop intensive, peut conduire à l'arrêt de l'écoulement par coagulation intra-laticifère des particules de caoutchouc : c'est l'encoche sèche. Ainsi, le rôle de l'éthylène exogène et de la blessure sur la production d'éthylène endogène a été étudié afin de mieux comprendre la régulation de tels phénomènes.

Trois gènes codant une ACC oxydase (*HbACO1; HbACO2 ; HbACO3*) et une codant une ACC synthase (*HbACS1*) ont été identifiés et caractérisés chez *Hevea brasiliensis*. Les séquences d'ADNc *HbACOs* ont respectivement une taille de 1115, 1183 et 1348 pb, avec une phase ouverte de-lecture (ORF) codant pour des polypeptides de 312, 318 et 318 acides aminés. Les structures des deux séquences génomiques *HbACO1* et *HbACO2* caractérisées sont différentes. En effet, *HbACO1* comportent 3 introns et 4 exons alors que *HbACO2* possèdent 2 introns et 3 exons. La région génomique du troisième membre *HbACO3* n'est pas entièrement isolée. En ce qui concerne *HbACS1*, le clone ADNc pleine longueur est de 1932 pb avec une ORF codant un polypeptide de 480 acides aminés ; le gène correspondant est d'une taille de 2928 pb avec une structure à 3 introns et 4 exons.

Tous les gènes *HbACO* sont exprimés à tous les stades de développement étudiés, du jeune plant à l'arbre exploité, et même dans les cals cultivés *in vitro* mais avec des profils très différents. Le gène *HbACO1* est exprimé à un niveau de base plus élevé que les autres gènes. Son expression décroît après traitement à l'éthylène ou à la blessure à la fois dans les feuilles et les écorces. Les gènes *HbACO2* et *HbACO3* sont au contraire sur-exprimés transitoirement en réponse au même traitement. Pour *HbACS1*, l'expression est induite à la fois par l'éthylène et la blessure. Un pré-traitement au 1-méthylcyclopropène (1-MCP), un inhibiteur de l'action de l'éthylène, abolit la sur-expression des gènes *HbACS1* et *HbACO2* induite par l'éthylène. Cela tend à démontrer que ces gènes sont sous une régulation positive de l'éthylène.

En conclusion, les résultats obtenus permettent de proposer que le gène *HbACO1* est impliqué dans la production d'un niveau de base d'éthylène et régulé négativement par des signaux environnementaux, tandis que les gènes *HbACS1, HbACO2* et *HbACO3* ne sont exprimés qu'en réponse aux facteurs externes. Un modèle de travail présentant le rôle potentiel de ces gènes sur la régulation de la biosynthèse d'éthylène et la régénération du latex est présenté.

MOTS-CLES

Hevea brasiliensis, ACC synthase, ACC oxydase, 1-MCP, éthylène, blessure, écorce, laticifère, feuille

INTITULE ET ADRESSE DE L'U.F.R. OU DU LABORATOIRE :

Equipe *Biotechnologies et génomique des plantes pérennes tropicales* – UMR 1098, Biologie du développement des espèces pérennes cultivées CIRAD - TA 80/03 - Avenue d'Agropolis - 34098 Montpellier