

Master Biologie, Géosciences, Agronomie, Environnement
Spécialité : Biologie fonctionnelle des plantes

Parcours : M1

Année Universitaire 2005-2006

Caractérisation des gènes de réponse à l'éthylène par *Reverse Northern* sur un clone à fort métabolisme PB260 chez *Hevea brasiliensis*



Saël GRAMDI

Responsable de stage : Pascal MONTORO

Soutenu le 3 juillet 2006



UMR BEPC

CIRAD- Département des cultures pérennes
Equipe biologie du développement de l'hévéa et du cacaoyer

REMERCIEMENTS

Merci à Mme Françoise Dosba directrice de l'UMR BEPC et Mr Jean Christophe Glasman directeur de l'UMR PIA, unités de recherche au sein desquels j'ai réalisé mon stage.

J'adresse un remerciement sincère à Mme Françoise Granet, responsable du laboratoire des cultures *in-vitro* du service plantation de la société de manufacture de pneumatique Michelin, pour le financement de mon stage et les contacts scientifiques que nous avons eu.

Je remercie Pascal Montoro, responsable de l'équipe *Biologie du développement de l'hévéa et de la production de caoutchouc naturel*, qui m'a accepté comme stagiaire et m'a formé à de nombreuses techniques de biologie moléculaire avec patience, clarté et précisions.

Merci également à toute l'équipe hévéa pour leur accueil et plus particulièrement à Julie Leclercq pour ses conseils pertinents et son aide régulière. Xavier Sabau, ingénieur robotique, nous a été d'une grande aide lors de la réalisation des filtres à haute densité.

Enfin je voudrais remercier l'ensemble des membres du laboratoire, chercheurs, techniciens et stagiaires pour l'ambiance chaleureuse qui a régné pendant ces quatre mois et le soutien apporter lors des moments difficiles et tout particulièrement Jean Louis Noyer, Franc-christophe Baurens, Jean-Christophe Breitler, Valérie Pujade-Renaud pour la correction du manuscrit.

ABBREVIATIONS

2,4-D	: acide 2,4 dichlorophénoxyacétique
ACC	: acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique
ADNc	: acide désoxyribonucléique complémentaires
ARNm	: acide ribonucléique messenger
ATP	: adénosine 5' -triphosphates
C4H	: cinnamate 4-hydroxylase
CTP	: cytosine 5' -triphosphate
CO ₂	: dioxyde de carbone
CoA	: Coenzyme A
CsCl	: chlorure de césium
CTR1	: constitutive triple reponse 1
dNTP	: nucléotides 5' -triphosphate
DO	: densité optique
EDTA	: acide éthylène diamine tétraacétique
EIN	: ethylene insensitive
ERS	: ethylene response sensor
EST	: expressed sequence tags
ETR	: ethylene response
GTC	: thiocyanate de guanidine
GTP	: guanosine 5' -triphosphate
HCl	: Chlorure d'hydrogène
HEPES	: acide N-2-hydroxyéthyl-pipérazine-N'-2-éthane sulfonique
HMG-CoA	: 3-hydroxy-3-méthylglutaryl Coenzyme A
MAP	: méthionine aminopeptidase
MCP	: méthylcyclopropène
MgCl ₂	: Chlorure de magnésium
NaAc	: Acétate de sodium
NADP(H)	: nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (réduit)
NaOH	: hydroxyle de sodium
PCR	: polymerase Chain Reaction
Pi	: phosphore inorganique
PPI	: pyrophosphate d'isopentényles
ppm	: parties par millions
PVP	: polyvinylpyrrolidone
RT	: reverse transcriptase
SAM	: S-adénosyl méthionine
SDS	: sodium dodécyl sulfate
SSH	: suppressive and subtractive hybridation
TAQ	: thermophilus aquaticus
TCP	: tricrésyl phosphate
Tep	: tonnes équivalent pétrole
Tris	: tris[hydroxy-méthyl] aminométhane
TTP	: thymine 5' triphosphate

Sommaire

INTRODUCTION.....	1
I. Contexte économique et écologique.....	1
II. Hévéaculture.....	1
III. Ethylène chez les plantes.....	3
IV. Problématique et objectifs.....	4
MATERIELS ET METHODES.....	5
I. Préparation des filtres à haute densité.....	5
II. Préparation des sondes radiomarquées.....	6
III. Analyse d'expression par <i>Reverse Northern</i>	7
RESULTATS.....	8
I. Collection de 189 unigènes.....	8
II. Amplification par PCR.....	8
III. Analyse globale des résultats obtenus par <i>Reverse Northern</i>	9
IV. Qualité de la banque SSH.....	9
V. Analyse des gènes exprimés lors de stimulation éthylénique.....	10
DISCUSSION.....	11
I. Comparaison des ESTs de référence et des banques SSH.....	11
II. Qualité des banques SSH d'origine.....	12
III. Validation de la collection d'ESTs et des données de <i>Reverse Northern</i>	12
IV. Etude de quelques gènes fortement sur-exprimés issus des banques SSH.....	12
PERSPECTIVES.....	15
BIBLIOGRAPHIE	

Résumé

L'*Hevea brasiliensis*, un arbre de la famille des Euphorbiacées, est la seule espèce qui produit assez de caoutchouc naturel pour être exploité de façon industrielle. Afin d'augmenter la production de cet élastomère, les cultivateurs appliquent sur les arbres de l'Ethrel®, un générateur d'éthylène. Cette stimulation éthylénique a pour conséquence une augmentation de l'écoulement et une régénération plus rapide du caoutchouc naturel.

Des Banques SSH (Hybridation suppressive et soustractive) réalisées précédemment à cette étude ont permis d'isoler des gènes de réponses à l'éthylène. Pour étudier les conséquences de la stimulation éthylénique au niveau moléculaire, la technique d'analyse *Reverse Northern* a été choisie comme outil afin de valider l'expression des clones SSH.

Tout d'abord les gènes issus des banques SSH ont été amplifiés par PCR avant d'être déposés sur des filtres haute densité. D'autre part des ARNtot ont été extraits de jeunes plants d'hévéa (clone PB260) ayant subi différents traitements (non stimulé et stimulé 8h ou 24h par de l'éthylène à 1ppm). Ces ARNtot ont alors été convertis en ADNc par transcription inverse avant d'être marqués radioactivement au dCT³²P afin de servir de sondes. Ces sondes radiomarquées ont ensuite été hybridées avec les filtres haute densité. Les résultats des hybridations ont alors été analysés à l'aide du logiciel Images Quant®. Ce programme a permis d'obtenir le profil d'expression des gènes étudiés, en concordance à 52% (98/189) avec les banques SSH, et nous a permis d'isoler des gènes potentiellement intéressants pour des programmes de transformation génétique.

Afin d'affiner l'étude de l'expression des gènes obtenus par SSH, la technique *Reverse Northern* sera prochainement utilisée avec des ARNtot provenant de différents clones (PB260, PB217, RRIM600) ayant subi divers stress abiotiques (éthylène et blessure) pendant des durées variable (1h, 4h, 8h, et 24h).

Abstract

Hevea brasiliensis, a member of the Euphorbiaceae family, is the only species which produce enough natural rubber to be exploited in an industrial way. In order to increase the production of this elastomer, the farmers apply Ethrel® to the tree, a generator of ethylene. This ethylenic stimulation has as a consequence an increase in the flow and a faster regeneration of the natural rubber.

The SSH banks (Suppressive and Subtractive Hybridization banks) carried out previously with this study made it possible to isolate from genes of response to ethylene. To study the consequences of ethylene stimulation at the molecular level, the analysis technique of Reverse Northern was selected in order to validate the SSH clone's expression.

At first, the genes resulting from the SSH bank were amplified by PCR before being deposited on high density filters. In addition, ARNtot were extracted from young seedlings having undergoes various treatments (not stimulated and stimulated 8h or 24h by ethylene at 1 ppm). These ARNtot were then converted into ADNc by Reverse Transcription before being radioactively marked by dCT³²P in order to be used as probes. This radioactive probes were then hybridizing with the high density filters. The results of hybridization were then analyzed using the software Images Quant®. This program made it possible to obtain the expression profile of the studied genes, in agreement with 52 % of the SSH banks, and to isolate from genes potentially interesting for genetic transformation programs.

In order to refine the study of the genes expression obtained by SSH, the Reverse technique will be soon used with ARNtot from various clones (PB260, PB217, RRIM600) having undergoes various abiotic stress (ethylene, and wound) for variable lengths of time (1h, 4h, 8h, or 24h).

INTRODUCTION

I- Contexte économique et écologique

Caoutchouc naturel et synthétique. Le caoutchouc naturel possède des propriétés encore inégalées par des produits synthétiques. Ses utilisations spécifiques sont multiples : pneus d'avions et de camions, supports des moteurs de véhicule, éléments de suspension des TGV, colles et rubans adhésifs à usage industriel, fils élastiques, gants, préservatifs, cathéters. Le caoutchouc naturel est produit à partir de l'hévéa. Cet agro-matériau renouvelable représente 40% de l'utilisation mondiale des élastomères avec 8,4 millions de tonnes en 2004 contre 11 millions de tonnes pour le caoutchouc synthétique. L'hévéa est une véritable « usine verte » qui permet la production d'un élastomère.

Séquestration du carbone et diminution de l'utilisation de l'énergie fossile. L'hévéa, de par ces caractéristiques écologiques, permet de produire deux produits renouvelables, le bois et le caoutchouc naturel. Ainsi, l'hévéaculture participe à la séquestration du carbone et s'inscrit dans une optique de développement durable. L'amélioration des techniques de culture, de récolte et de transformation du latex constitue également un bon engagement pour le développement durable et la lutte contre les émissions de CO₂. La valorisation des sous-produits de cette culture, notamment le bois, ce fait après abattage d'une parcelle non rentable. Ce bois est utilisé pour la production de meubles massifs de qualité, de parquets et autres boiseries. De plus, on pense que l'hévéa peut participer efficacement à la lutte contre l'érosion des sols et qu'il peut réhabiliter progressivement les terrains érodés.

II. Hévéaculture

Botanique et histoire de l'hévéa. Le caoutchouc naturel (cis-1-4 polyisoprène) est synthétisé par plus de 2500 espèces rassemblées dans 300 genres issus de 7 familles : *Euphorbiaceae*, *Apocynaceae*, *Asclepiadaceae*, *Asteraceae*, *Moraceae*, *Papaveraceae* et *Sapotaceae* (Mooibroek et al. 2000). La famille des Euphorbiacées, avec le genre *Hevea*, représente la famille la plus productrice de latex. Au sein du genre *Hevea*, il existe 10 espèces dont l'espèce *Hevea brasiliensis*. Originaire d'Amérique du sud (2% de la production mondiale à l'heure actuelle), c'est actuellement la seule source rentable de caoutchouc naturelle (Jacob et al. 1995). En 1876, un anglais, Sir Henry Wickham, rapporta clandestinement du Brésil des milliers de graines

d'hévéa au jardin botanique de Kew en Angleterre. Les plants provenant de ces graines furent ensuite transférés au nouveau jardin botanique de Singapour. Ce matériel végétal est à l'origine des premières plantations d'hévéa dans l'État malaisien de Perak puis de toutes les plantations de caoutchouc des pays de l'Asie du Sud-Est (représentant aujourd'hui 92% de la production mondiale avec 4 grands producteurs : Malaisie, Indonésie, Inde et Thaïlande) à partir du début du XIX^{ème} siècle.

La saignée. La saignée est une encoche au niveau de l'écorce permettant l'écoulement du latex. Elle est réalisée de gauche à droite en une diagonale descendante afin de permettre l'écoulement mais également de sectionner le maximum de cellules laticifères en suivant leur schéma de différenciation en spirale autour du tronc (Auzac et al. 1997). Lorsque l'écorce est sectionnée, la pression de turgescence expulse le latex contenu dans les laticifères. Il en résulte un écoulement plus ou moins long qui est stoppé par la coagulation des particules de caoutchouc.

Utilisation de l'éthéphon. Afin d'augmenter la production de latex de nombreux traitements ont été testés dont des traitements chimiques qui incluent notamment l'acide borique, le chlorure mercurieux, le peroxyde d'hydrogène ou l'acétylène (Auzac J. et al. 1997). Tous ces traitements permettent d'augmenter la production exogène ou endogène d'éthylène aboutissant à une augmentation plus ou moins importante du temps d'écoulement du latex ainsi qu'une augmentation de l'activité du métabolisme laticifère, les deux facteurs limitants de la production (Jacob JL et al. 1998). Tous ces traitements ont été remplacés par un générateur d'éthylène, l'acide 2-chloroethyl-phosphonique (éthéphon ou Ethrel®) possédant un effet stimulant remarquable. On sait notamment qu'il active certains enzymes, comme l'ATPase de la membrane des lutoïdes, l'invertase ou la glutamine synthétase (Pujade-Renaud V. et al. 1994). L'activation des ATPases aboutit à l'accélération de la synthèse de caoutchouc. La glutamine synthétase permet l'assimilation de l'azote mais surtout la production d'acides aminés indispensables à la régénération du latex. L'éthylène permet également d'augmenter la stabilité des lutoïdes ce qui a pour conséquence de retarder leur dégradation et donc la coagulation. De plus l'éthylène active de nombreuses voies tel que la défense contre le stress oxydatif ou encore la régulation de la production de protéines de défenses.

Système laticifère. Le caoutchouc est localisé dans des petites particules en suspension dans le latex, qui est le contenu de cellules vivantes spécifiques appelées cellules laticifères (Figure 1),

localisées dans toutes les parties de l'arbre (feuilles, écorce et racines) mais seul le tronc est exploité. Afin de compenser la perte de matériel cellulaire provoquée par la saignée, la régénération du latex *in situ* doit être la plus complète et la plus rapide possible. Elle est rendue possible grâce aux noyaux et aux mitochondries qui ne sont pas expulsés lors de la saignée. La synthèse du caoutchouc a comme origine le saccharose produit par la photosynthèse (Auzac et al. 1997). Ce sucre est absorbé activement au niveau de la membrane plasmique des cellules laticifères. Son hydrolyse lors de la glycolyse permet la formation de molécules d'Acétyl-CoA produisant ainsi du pyrophosphate d'isopentényles (PPI) (Figure 2). Les molécules de *cis*-polyisoprène sont obtenues par la fixation de plusieurs milliers d'unités de PPI toujours en configuration *cis* (Kush 1994), ce qui est à la base des qualités technologiques du caoutchouc. Les particules de caoutchouc sont entourées d'une membrane où sont fixés des N-acétylglucosamines qui permettent la liaison entre particules du caoutchouc en présence d'hévéine (Figure 3) (Auzac et al. 1997).

L'hévéine est une lectine présente au niveau des lutoïdes (Gidrol et al. 1994). Les lutoïdes sont des particules sphériques qui interviennent, dans le maintien de l'homéostasie du système laticifère (au travers de multiples systèmes de transport) (Figure 3) ainsi qu'au niveau de la coagulation du latex (Figure 4) (Auzac et al. 1995).

Le caoutchouc naturel est un métabolite secondaire de la famille des terpènes. Les métabolites secondaires sont produits en petites quantités et demandent beaucoup d'énergie. La mise en exploitation des hévéas va induire une production importante de latex en détournant l'énergie du métabolisme primaire vers le métabolisme secondaire. Ce qui ralentit la croissance et le développement des arbres.

III. Ethylène chez les plantes

Biosynthèse et signalisation de l'éthylène. Les voies de biosynthèse (Figure 5) et de signalisation (Figure 6) de l'éthylène sont bien connues chez plusieurs espèces dont *Arabidopsis thaliana*. L'éthylène a pour origine la méthionine. Dans le cycle de Yang, elle est transformée en S-Adénosyl-Méthionine (SAM) en présence d'ATP par la SAM synthétase. La SAM est ensuite dégradée en 5' méthylthioadénosine et en ACC (Acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique) par l'ACC synthase. Une partie de l'ACC est ensuite convertie en éthylène (volatil) grâce à l'ACC oxydase. Le reste va se conjuguer avec du N-Malonyl pour donner du N-Malonyl ACC (non volatil) qui constituera une réserve métabolique (Wang et al. 2002).

Entre 1990 et 2000, les composants de la voie de signalisation de l'éthylène ont été identifiés. Chez *Arabidopsis*, il existe 5 récepteurs à l'éthylène ETR1, ETR2, ERS1, ERS2 et EIN4. ETR1 et ERS1 possèdent trois domaines transmembranaires et un domaine histidine kinase actif qui fonctionne en dimère. ETR2, EIN4, ERS2 possèdent quatre régions transmembranaires dont un domaine histidine kinase dégénéré. L'éthylène se fixe au niveau N-terminal de ces récepteurs. Cette fixation requiert du cuivre comme co-facteur, et donc un transporteur de cuivre, RAN1. En absence de signal éthylénique, les récepteurs, comme ETR1, vont activer une Raf-like kinase, CTR1, qui régule négativement EIN2 par une cascade MAP-kinase. EIN2 possède un domaine hydrophobe N-terminal similaire au NRAMP, protéines de transport de métal. EIN2 régule positivement la voie de signalisation en activant des facteurs de transcriptions de la famille EIN3 (EIN3, EIL1, EIL2) localisé dans le noyau. EIN3 se fixe sur le promoteur du gène ERF1. Enfin, les facteurs de transcription ERF1 ou autre EREBPs peuvent interagir avec la boîte GCC du promoteur du gène cible et activé ainsi une réponse à l'éthylène (Wang et al. 2002, Guo et al. 2004, Alonso et al. 2004). Par contre, on constate que chez l'hévéa nous possédons peu d'informations concernant la voie transduction de l'éthylène.

IV. Problématique et objectifs

Problématique de recherche. Il existe différents types de clones :

- Les clones à métabolisme peu actif, comme le clone PB 217, qui présente une production faible de latex en absence de stimulation éthylénique (caractérisée par une faible teneur en Phosphore inorganique (Pi) et une teneur en saccharose élevé).
- Les clones à métabolisme moyennement actif, comme le clone RRIM 600, dont la production de latex est moyenne en absence de stimulation éthylénique, mais lorsqu'il y a stimulation leur métabolisme est significativement activé dans la limite du saccharose disponible.
- Les clones à métabolisme très actif, comme le clone PB 260, qui naturellement possède une activité métabolique intrinsèque élevée, mais sur qui la stimulation éthylénique présente un certain danger car elle peut provoquer des encoches sèches.

La problématique de l'équipe du CIRAD dans laquelle j'effectue mon stage est l'optimisation du potentiel de production sans induire des problèmes de dysfonctionnement cellulaire tel que l'encoche sèche, arrêt partiel ou total de l'écoulement de latex (Jacob et al., 1994).

Travaux en cours chez l'hévéa. En 2004, l'équipe du CIRAD a réalisé une banque SSH (hybridation soustractive et suppressive) qui est une méthode de criblage différentiel de banques

d'ADNc couplée à la PCR (Cécile Lefrançois, 2004). Cette technique permet de supprimer les ARNm communs à deux échantillons (des arbres traités et non traités à l'éthylène) et de normaliser les niveaux d'expression des gènes afin de repérer les ARNm exprimés de façon différentiel entre les deux conditions. Les données de séquence ont été analysées sur le pipeline du CIRAD (Xavier Argout, 2005). Ainsi, 158 unigènes ou gènes non redondants ont pu être identifiés dans cette collection d'EST (Expressed Sequence Tags).

Objectifs du stage. Ce stage vise à analyser les effets de la blessure et de l'éthylène sur l'expression des gènes isolés par SSH afin de mieux appréhender l'impact de la saignée et de l'application d'Ethrel® sur le métabolisme laticifère. Pour cela, nous utiliserons la technique de *Reverse Northern* qui permettra d'identifier les gènes induits ou réprimer lors des stress abiotiques.

MATERIELS et METHODES

I. Préparation des filtres à haute densité

Matériel biologique. Deux banques SSH ont été réalisées à partir d'ARN extraits d'écorces d'arbres matures non exploités qui ont été traité ou non à l'Ethrel® (Lefrançois, 2004). Après séquençage des 1158 clones obtenus (Genome Express, France), les données de séquences ont été analysées par bioinformatique (logiciel StackPACK™) sur la chaîne de traitements automatisée du CIRAD (Xavier Argout, UMR-PIA), et cette analyse a permis d'isoler 158 unigènes auxquels ont été ajouté des gènes de références, notamment 2 gènes intervenants dans le métabolisme primaire, 7 dans le métabolisme du latex, 7 dans le métabolisme du caoutchouc, 7 au niveau du stress oxydatif et 8 au niveau de la biosynthèse de l'éthylène.

Collection d'unigènes. Les 189 unigènes sélectionnés ont été ordonnés au sein de deux plaques 96 puits Cellstar® (greiner bio-one) de culture bactérienne. Les unigènes issus des banques SSH ont été clonés dans le vecteur pGem-T-Easy (Progema, *E. coli* DH5α) et les gènes de référence au sein de 6 vecteurs différents (Tableau 1).

Amplification par PCR des insertions. Sur la base des données de séquençage, la taille des inserts et des régions plasmidiques amplifiées ont été calculée. Les bandes attendues évolueront entre 205 et 1880 paires de base (pb). L'amplification a été réalisée avec différentes amorces suivant les plasmides ayant servi au clonage des EST (Tableau 1)

Conditions de l'amplification PCR. Afin d'amplifier les ESTs sélectionnées, il a été utilisé le Taq CORE Kit 25 de QBiogene (Illkirch, France) dans 50µl de volume final suivant les recommandations du fabricant. La programmation des machines PCR a été réalisée comme mentionnée dans le tableau 2

Précipitation des produits PCR. Après vérification des PCR (sur gel d'agarose 1,5%) répétées au moins 5 fois de façon à obtenir suffisamment de matériel, on regroupe l'ensemble des ADN au sein d'une même plaque. Ces ADN sont précipités par ajout d'acétate de sodium (NaAc, pH=5,2 3M) et d'éthanol absolue avant de pouvoir les récupérer par centrifugation. Une fois rincé à l'éthanol 70%, les ADN sont repris dans 30µl d'eau Merck®. On peut alors les quantifier par fluorimétrie (réactif de Hoechts) avec le Fluoroskan Ascent de Thermo (Electron Corporation, Vantaa, Finland). Les ADN doivent posséder une concentration suffisante (400ng/µl) afin d'être déposés sur filtres haute densité. Avant cela, il faut rassembler les deux plaques 96 puits dans une plaque 384 contenant deux fois les deux plaques 96 (tableau 3). On peut alors déposer les ADN sur membranes de Nylon Hybond™ -N+ d'Amersham biosciences grâce au robot Flexy's de Genomic Solutions (U.K.). Le robot charge à 4 reprises 12nl d'ADN d'où une quantité finale d'environ 10 ng ADN/spots. Le robot effectue une réplification de chaque gène qu'il dépose côte à côte.

II. Préparation des sondes ADNc radiomarquées

Matériel végétal et traitements

Trois clones d'hévéa (PB260, PB217 et RRIM600) greffés en serre et cultivés à 25°C sont utilisés. Les plants sont placés dans des caissons hermétiques dans lesquels de l'air (témoin) ou 1 ppm d'éthylène est ajouté à l'aide d'une seringue. Les feuilles et les écorces des plants sont prélevées après 1h, 4h, 8h, 24h de traitement. D'autres plants quand à eux ont été blessés manuellement par scarification de l'écorce ou bien pincement des feuilles.

Extraction des ARN totaux

Elle est réalisée sur des feuilles ou des écorces provenant des clones ayant subi les différents traitements. Le matériel végétal a été broyé dans de l'azote liquide permettant d'obtenir une poudre placée dans du tampon d'extraction (31mM GTC, 0,88% de sarcosine, 0,9% de PVP, de 25mM NaAc et de β-mercapto-éthanol 1%).

Les échantillons sont ensuite centrifugés afin de précipiter les débris cellulaires (30 minutes à 4°C à 10000g). Le surnageant est alors déposé sur coussin de chlorure de césium (24mM NaAc, 45,6mM CsCl). Après une ultracentrifugation de 20 heures à 20°C à 25000rpm, un culot d'ARN dense est obtenu, composé des seuls éléments du broyat capable de traverser le coussin de CsCl. Le culot obtenu est alors lavé à l'éthanol 70% avant d'être repris dans 200µl d'eau. Les ARN totaux extraits ont ensuite été dosés par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 260nm afin de déterminer leurs concentrations, indispensable à la synthèse des ADNc.

Synthèse et purification des ADNc. La synthèse des ADNc est réalisée sur 5µg d'ARN totaux avec l'enzyme Revertaid™ M-MuLV Reverse Transcriptase de Fermentas (Paris, France), en suivant le protocole du fabricant à la différence que 2 µl d'enzyme RT ont été utilisés au lieu de 1µl. Après synthèse des ADNc, l'élimination des ARN est faite par alcalinisation (NaOH 2,5M). Cette dénaturation réalisée, la soude a été neutralisée avec du tampon (HEPES 1M). Les ADNc sont alors purifiés par fixation sur des billes de silice à l'aide du Kit 250 QIAquick PCR Purification (Qiagen, Hilden, Allemagne). Ensuite, 2 éluions sont réalisées avec 40µl d'eau permettant de libérer l'ADNc des billes de silice après centrifugation.

Vérification de la synthèse des ADNc. Elle est réalisée par PCR avec les amorces du gène constitutif de l'actine. Pour cette amplification PCR, le Taq CORE Kit 25 de QBiogene (Illkirch, France) est utilisé avec 5µl d'ADNc pour un volume final de 50µl.

Marquage et vérification des sondes (ADNc). Le marquage des ADNc s'effectue au dCT³²P avec le kit Megaprime labelling system (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, Angleterre) suivant le protocole du fabricant en utilisant 31µl d'ADNc pour un volume final de 50µl. La vérification est réalisée par chromatographie sur papier Whatman, sur lequel on dépose 1µl de sondes avant de le mettre dans du tampon phosphate à 0,75M. Une fois la chromatographie achevée, le support est mis dans une cassette avec un film photographique. Après 15min d'exposition, on révèle le film.

III. Analyse d'expression par *Reverse Northern*

Pré-hybridation des filtres haute densité. La pré-hybridation est réalisée dans un tampon. Il est constitué de 4ml de SSC 25X, 1ml de Tris-HCl 1M, 400µl EDTA 0,5M, 200µl SDS 20%, 13,6ml

d'eau déminéralisée, 400µl denhardt 50X et de 200µl d'ADN de sperme de saumon à 10mg/ml. Les membranes sont placées dans un tube à hybridation contenant 20 ml de tampon puis mis à incubées à 65°C sous agitation pendant une nuit.

Hybridation des filtres à haute densité. Le tampon de pré-hybridation est remplacé par 20 mL de tampon d'hybridation contenant 4ml de SSC 25X, 1ml de Tris-HCl 1M, 400µl EDTA 0,5M, 200µl SDS 20%, 9,6ml d'eau déminéralisée, 400µl denhardt 50X, 200µl d'ADN de sperme de saumon à 10mg/ml et 4ml de dextran sulfate 50% dans lesquels on rajoute les 50µl de sonde radiomarquées. L'hybridation se fait également sous agitation à 65°C pendant une nuit.

Lavage, exposition et révélation des membranes. Une fois les membranes hybridées, elles sont lavées afin d'enlever les sondes non hybridées. Pour cela on réalise deux solutions de 40ml, une solution de rinçage (SSC 2X) que l'on agite pendant quelques secondes avec les membranes, et une solution de lavage (SSC 2X et SDS 0,1%) qui ont été mise en présence des membranes pendant 10min à 65°C. Après lavage, les membranes sont déposées dans des cassettes (Amersham biosciences, Buckinghamshire, U.K.) et mises en contact avec un écran au phosphore (Storage Phosphor Screen, Amersham biosciences, Buckinghamshire, U.K.) pendant une nuit. Après cette exposition on les révèle au Phosphoimager STORM 820 d'Amersham.

Quantification des intensités et traitement des données. Les intensités d'expression sont alors quantifiées par le logiciel ImageQuant TL (Amersham biosciences, Buckinghamshire, U.K.). Les données sont alors traitées sur Excel. Dans un premier temps on soustrait le bruit de fond, puis on fait les rapports valeurs obtenues sur valeur moyennée de l'expression de l'actine (3 spots par membranes). Enfin, on moyenne les valeurs d'intensité d'expression pour chaque gène qui ont été déposés en dupliqua. Ces deux valeurs correspondent à des répétitions expérimentales et leurs valeurs moyennes d'intensités d'expressions sont ensuite comparées au témoin (ARN extraits de clones PB260 non traité).

RESULTATS

I- Collection de 189 unigènes ou ESTs

Les ESTs sélectionnées ont été réparties dans 2 plaques 96 puits. Cette collection comprend des ADNc dont les séquences peuvent être partielles ou pleines longueurs. La taille connue des inserts a permis d'en déduire la taille des produits PCR. Il est à noter que les 92 ESTs présents sur la plaque numéro 1 (Tableau 4a) sont clonés dans 6 vecteurs différents, ce qui a impliqué l'utilisation de 6 couples d'amorces pour les amplifications (Tableau 1). Ces amplifications ont donc été difficiles à réaliser. Les 91 ESTs présents au niveau de la plaque 96 puits numéro 2 (Tableau 4b) proviennent tous des Banques SSH₀₋₂₄ et SSH₂₄₋₀ et sont par conséquent clonés dans un seul vecteur (pGEM-Teasy). La réalisation des réactions PCR a donc été plus facile à réaliser que précédemment. Les puits vides contenaient uniquement du milieu de culture et ont servi de base pour la détermination des bruits de fonds présents sur les membranes.

II- Amplification par PCR

La majorité des produits PCR (79%), qui vont servir de matrice ADN et être fixés sur les filtres haute densité, possèdent un profil "simple bande". La collection d'EST est conservée sous forme de clones bactériens qui ont servi de matrice ADN pour des réactions PCR. A partir de ces premières réactions (diluées 10 fois), 6 amplifications différentes ont été réalisées pour obtenir suffisamment de matrice ADN. Parmi les 189 ESTs, ont pu être amplifiés 164 clones au total (89% de la plaque 1 et 90% des clones de la plaque 2). Ces produits PCR ont donné des profils "simple bande" (79% des clones) ou "double bande" (10% et 11% des clones) (tableau 5). Les clones doubles bandes ne seront pas exploitables après *Reverse Northern* étant donné qu'un mélange de clones peut donner des niveaux d'expressions erronés. Afin d'obtenir ces pourcentages relativement corrects d'amplification (79% des clones) des dizaines de réactions PCR ont été nécessaires étant donné la mauvaise qualité de Taq (*Thermophilus aquaticus*) polymérase qui ne permettait pas une bonne reproductibilité des amplifications. En effet d'une PCR à l'autre, réalisées dans les mêmes conditions, le nombre de clones amplifiés variait énormément. De plus des clones amplifiés lors de la première réaction PCR ne l'étaient plus lors

de la seconde et inversement. Ces problèmes ont put être éliminés grâce à aux nouveaux Kits de QBIOgenes®.

III- Analyse globale des résultats obtenus par *Reverse Northern*

Cette analyse permet de répartir les ESTs en différents groupes de niveaux d'expression en réponse à la stimulation éthylénique par rapport à un témoin non stimulé (tableau 3). Pour les analyses *Macro-Array*, la variation du bruit de fond étant de 50%, nous avons retenu les EST au moins sur-exprimées 2X. Les ESTs sont classés suivant leur degré de sur-expression, entre 2 à 5 fois par rapport à l'expression du témoin (36 et 38 clones), 5 à 10 fois (26 clones), 10 à 50 fois (16 et 27 clones), 50 à 100 fois (2 et 1 clones) et 100 à 200 fois (2 clones). On remarque que la majorité des clones sont sur-exprimés moins de 10 fois par rapport au témoin (77,5% des clones pour 8h et 68% pour 24h), alors que peu de clones ont une expression supérieure à 10 fois celle du témoin (22,5% des clones pour 8h et 30% pour 24h). Un descriptif des gènes sur-exprimés au moins 10 fois en comparaison au témoin sera réalisé dans la suite de cette étude. Ce seuil de facteur 10 a été choisi de façon arbitraire. En dessous de ce facteur 10, la sur-expression est moins significative étant donné la variabilité des bruits de fond (fluctuent en moyenne entre 0,5 et 1,5 fois par rapport au témoin), ce qui rend difficile l'analyse des gènes sous-exprimés (entre 0 et 0,5 fois). De plus, ce seuil nous a permis de réduire le nombre de gènes à étudier en passant de 80 et 94 ESTs sur-exprimés, respectivement pour les 2 plaques à 35 au total. Ce nombre d'ESTs et de plus suffisant pour classer les gènes par familles.

IV- Qualité de la banque SSH

Pour la banque SSH₀₋₂₄, correspondant à une hybridation soustractive des ARN totaux issus de jeunes clones de PB260 non stimulés auxquels on a soustrait les ARN totaux issus de jeunes clones de PB260 stimulés 24h par l'Ethrel® 2,5%, on aurait pu penser que les 24 gènes soient sous-exprimés alors que seulement 2 sont sous-exprimés et 1 est sur-exprimé.

La banque SSH₂₄₋₀, correspondant à une hybridation soustractive des ARN totaux issues de jeunes clones de PB260 stimulés 24h par l'Ethrel® 2,5%, auxquels a été soustrait les ARN totaux issus de jeunes clones de PB260 non stimulés. On observe que sur les 134 gènes

potentiellement sur-exprimés de la banque SSH₂₄₋₀ 61 sont sur-exprimés et 4 sous-exprimés (Tableau 4).

Nous pouvons donc dire que la qualité des banques SSH est moyenne puisque seulement 158 unigènes sur 1158 clones de départ ont été obtenus. Toutefois, l'ensemble des EST sont exprimés dans de jeunes plants et bien qu'il soit très difficile d'appréhender par la méthode *Reverse Northern* les gènes sous-exprimés, 6 EST ont pu être mis en évidence sur 158 unigènes.

V- Analyse des gènes exprimés lors de stimulations éthyléniques

Parmi les 189 ESTs très peu sont sous-exprimés en réponse à l'éthylène (6) (tableau 5). La majorité étant sur-exprimés à 8h et 24h, de 18 à 27 ESTs sont fortement sur-exprimés (>10 fois par rapport au témoin). Parmi ces gènes sur-exprimés, on peut voir des gènes impliqués dans le métabolisme des cellules laticifères (biosynthèse caoutchouc naturel et latex), la détoxification des radicaux libres (stress oxydatif), la biosynthèse de l'éthylène (notamment ACS et ACO), et des gènes de réponse à l'éthylène présents dans les banques SSH₀₋₂₄ et SSH₂₄₋₀. On ne note pas de différence majeure entre 8h et 24h de traitement à l'Ethrel® si ce n'est un nombre légèrement supérieure de gènes sur-exprimés à 24h comparativement à 8h.

Certains gènes montrent un fort niveau d'expression transitoire soit à 8h, soit à 24h ou maintenu entre 8h et 24h. Parmi les 80 gènes sur-exprimés (2 fois par rapport au témoin) pour 8h de stimulation éthylénique et les 94 gènes sur-exprimés pour 24h, nous avons sélectionné les 35 gènes sur-exprimés 10 fois. On observe donc que 35 gènes sont induits fortement par l'éthylène, dont 14 ont été validés par RT-PCR semi-quantitative (gènes de référence), 20 gènes issues de la banque SSH₂₄₋₀ et 1 gène issue de la banque SSH₀₋₂₄ (Tableau 6).

Parmi ces gènes sur-exprimés, on peut noter :

- Cinq gènes de ménage, dont une *fibrillar-like protein* (présent dans le nucléole), des protéines ribosomales (S15, P0, YL16) ainsi qu'une *ubiquitin-like protein* (intervenant dans la régulation des protéines)
- Quatre gènes impliqués dans la détoxification des radicaux libres (Ascorbate peroxidase, 2 GCLs, glutathion réductase), pour lesquels les niveaux de sur-expression correspondent à ceux enregistrés par RT-PCR semi-quantitative.

- Cinq gènes impliqués dans la biosynthèse de l'éthylène (HbACS-F2, F3, D10, HbACO-48, E4) pour lesquels il y a correspondance entre les niveaux de sur-expression enregistrés par *Reverse Northern* et RT-PCR semi-quantitative

- Quatre gènes impliqués dans le métabolisme laticifère (Hévéine, chitinase, Hmg, hévamine) pour lesquels il y a correspondance entre les niveaux de sur-expression observés par *Reverse Northern* et RT-PCR semi-quantitative.

DISCUSSION

I- Comparaison entre ESTs de référence et ESTs des banques SSH

L'analyse globale d'expression des unigènes montre une très nette cohérence vis à vis des niveaux d'expression connus chez les gènes de référence qui ont complété notre collection.

Notamment, pour les ESTs sur-exprimés 10 fois par rapport au témoin, Hb ACC Oxydase-O48 et Hb ACC Synthase (E4, F2, F3) enzymes essentielles dans la biosynthèse de l'éthylène, les GCLs (chloroplastique et cytoplasmique) enzymes limitantes de la synthèse du glutathion (antioxydant) et les HMG-CoA (2 et 3) enzyme de la voie des mévalonates conduisant à la synthèse des isoprénoïdes. On peut dire que les résultats obtenus avec l'analyse *Reverse Northern* sont cohérents étant donné qu'une analyse comparative par RT-PCR semi-quantitative pour environ 50% des clones (14/35) a permis de confirmer les données d'expression.

Toutefois, une restriction est à apporter quant aux gènes sous-exprimés pour lesquels nous sommes confrontés au niveau de sensibilité de la méthode *Reverse Northern*. Lors de cette étude, les bruits de fond ont été calculés à partir des puits contenant uniquement du milieu de culture (4 et 5 puits par plaques). Pour l'analyse des *Macro-Array*, il est généralement calculé un bruit de fond local autour de chaque point, étant donné qu'il peut y avoir une forte variabilité entre les différentes parties des membranes. Cependant, les temps d'exposition nécessaires accentueraient les bruits de fonds et cette méthode n'a pas donné de résultats convenables. Nous avons donc retenu une méthode de soustraction de bruit de fond moyenné au niveau des 4 puits <<contrôle négatif>>.

L'origine des EST issus des banques SSH est l'écorce d'arbre mature soumis ou non à une stimulation à l'éthéphon. A ce stade, on pouvait noter une faible teneur en ARN total avant traitement qui augmentait très fortement et rapidement, dès 4h, suite à la stimulation.

- Chez les plants immatures cultivés en serre, les ESTs isolés chez les plants matures sont exprimés. De plus, nous observons un phénomène de régulation sensiblement identique entre les deux stades : forte réponse à l'éthylène avec 80 et 94 ESTs sur-exprimés respectivement 8 et 24 h après traitement.

II- Qualité des banques SSH d'origine

Pour les deux banques SSH réalisés (SSH₀₋₂₄ et SSH₂₄₋₀) 1158 clones ont été obtenus, dont 309 issus de la première banque (potentiellement sous-exprimés) et 849 issus de la deuxième banque (potentiellement sur-exprimés). Sur cet ensemble de clones seules 336 séquences se sont révélées exploitables. Le séquençage avait alors permis d'isoler 158 unigènes. A l'issue de l'analyse par Reverse Northern, nous avons obtenu seulement 2 EST sous-exprimés (8,5%) et 1 EST sur-exprimé pour la banque SSH₀₋₂₄ alors que 24 ESTs étaient potentiellement sous-exprimés. Pour la Banque SSH₂₄₋₀ nous avons obtenu 61 EST sur-exprimés (45%) et 4 EST sous-exprimés alors que 134 ESTs sont potentiellement sur-exprimés. Ces résultats sont assez moyens car en générale entre 50% et 70% des ESTs sont validés par analyse *Reverse Northern*.

III- Validation de la collection EST et des données de *Reverse Northern*

Nous avons isolé 68 gènes qui répondent à la stimulation éthylénique sur 189 gènes de la collection.

Des gènes de références, dont l'expression a déjà été validée par RT-PCR semi-quantitative, ont permis de confirmer les résultats obtenus par *Reverse Northern* étant donné la similarité obtenue entre les deux techniques. Pour les gènes sur-exprimés d'un facteur 10, on obtient 40% des gènes provenant de la collection de référence et 60% de nouveaux gènes ayant pour origine les banques SSH.

On remarque qu'il y a plus de gènes exprimés pour 24h que pour 8h, ce qui est en concordance avec la banque SSH qui a été réalisée à partir d'ARN extraits d'écorces de clones PB260 stimulés 24h à l'éthylène.

IV- Etude de quelques gènes fortement sur-exprimés issus des banques

➤ Métabolisme laticifère, synthèse d'ARN (biosynthèse du caoutchouc)

Le cinnamate 4-hydroxylase (C4H) est une enzyme qui catalyse une réaction clé de la voie des phénylpropanoïdes dont dépend la biosynthèse de nombreux métabolites secondaires. Cette enzyme posséderait donc un rôle dans la biosynthèse du caoutchouc, métabolite secondaire chez *Hevea brasiliensis* (Lu et al. 2006).

HMG-CoA substrat NADPH-dépendant de la HMG-CoA réductase, enzyme intervenant dans la voie mévalonate, conduisant à la biosynthèse des isoprénoïdes. Le caoutchouc naturel étant un cis-polyisoprène, HMG-CoA jouerait un rôle fondamental dans la production de cet élastomère (Nagegowda et al. 2005).

Les enzymes de la superfamille des Aldo/Keto reductase (AKR) sont monomériques. Ce sont des oxydoréductases utilisant le NADPH comme cofacteur et permettant de métaboliser un large panel de substrats chimiques. La structure de la chalcone réductase sert comme modèle de base pour la structure des autres membres de la famille des Aldo/Keto reductases comme la codéinone réductase intervenant dans la biosynthèse de la morphine. Donc les AKR sont des oxydoréductases permettant la synthèse de métabolites secondaires et il est possible qu'elles jouent un rôle dans la production de caoutchouc naturel (Gavidia et al. 2002)

➤ Gènes de ménage et synthèse protéique

Les Cyclophilines peptidylprolyl isomérasés s'associent préférentiellement avec des régions membranaires enrichies en super complexe photosystème II. Elles sont définies comme des immunophilines, une famille de protéines ubiquitaires qui ont été identifiées comme des récepteurs intracellulaires. Les immunophilines sont connues pour être localisées dans tous les compartiments sub-cellulaires des plantes ayant généralement pour cible le chloroplaste (Romano et al. 2004). Nous savons que l'éthylène permet d'augmenter la production de caoutchouc, et que cette dernière a besoin de sucre produit par la photosynthèse. La sur-expression des immunophilines semble donc en cohérence avec les données antérieures

Les fibrillarines sont des protéines nucléaires connues pour être impliquées dans le développement de précurseurs d'ARN ribosomiaux, elles auraient donc un rôle au niveau de la

synthèse protéique qui serait plus important lors de la stimulation éthylénique stimulation (Pih et *al.* 2000)

La Méthionine AminoPeptidase (MAP) prend en charge l'excision de la méthionine N-terminale d'une protéine lors de l'étape de maturation chez les eucaryotes. Les MAPs sont régulées spécifiquement en fonction des organes et du développement. Il est possible que cette sur-expression traduise une production de nombreuses protéines en réponse à la stimulation éthylénique (Ross et *al.* 2005).

TCP est un complexe chaperone hétéro-oligomérique présent dans toutes les cellules eucaryotiques. Il contribue principalement au rassemblement de l'actine et de la tubuline intervenant dans la formation du cytosquelette, favorisant les mouvements cellulaires. La sur-expression de TCP, une hormone induite par stress, peut confirmer la perception de la stimulation éthylénique comme un stress au niveau cellulaire.

➤ **Stress oxydatif, défense, détoxification des radicaux libres**

L'ascorbate peroxidase permet la détoxification des radicaux libres. La stimulation éthylénique induit une augmentation des formes toxiques de l'oxygène. Une sur-expression de cet enzyme découle de l'application d'éthylène comme l'ont confirmé les résultats obtenus par RT-PCR semi-quantitative (Gebelin, 2006).

Après avoir analysé les gènes fortement sur-exprimés par l'éthylène issue des banques SSH, on remarque que leurs fonctions peuvent être rapprochées de la biosynthèse du caoutchouc, ou de la perception, par la plante, de la stimulation éthylénique comme un stress.

Les gènes isolés semblent donc fortement intéressants même si il reste à les valider par des répétitions biologiques.

En conclusion, les annotations réalisées sur ces EST permettent de proposer que :

- Ces gènes sont essentiellement responsables de la transcription et de la protéosynthèse ce qui est favorable à la régénération du latex.
- On retrouve aussi des gènes impliqués dans la défense contre le stress oxydatif, ce qui permet de maintenir une stabilité des lutoïdes et ainsi prolonger l'écoulement de latex.

- La sur-expression de certains gènes impliqués dans la biosynthèse de l'éthylène permet de proposer qu'il y ait une synthèse auto-catalytique de cette hormone.
- Enfin, l'identification de certains gènes liés à la sénescence rend compte des effets négatifs de l'éthylène sur le fonctionnement des cellules laticifères (comme les QM protéines impliqué dans les phénomènes d'apoptose).

Ces premiers résultats donnent donc une idée de l'effet de l'éthylène sur le métabolisme de l'hévéa, mais des études plus avancées seront nécessaires pour confirmer et approfondir nos connaissances sur les effets complexes de la stimulation éthylénique au niveau de l'hévéa.

PERSPECTIVES

Il sera intéressant de purifier les ESTs qui ont été contaminées afin d'avoir une collection d'unigènes de meilleur qualité. En effet, certains puits contenant des ESTs présentent des doubles bandes après PCR. La décontamination demandera de réaliser une culture bactérienne afin de séparer les différentes colonies présentes. Après quoi, l'amplification par PCR permettra d'isoler le clone voulu du clone contaminant.

Les RT pourraient être réalisées à partir de 10 μ g d'ARNtot au lieu des 5 μ g utilisés lors de cette étude afin d'observer si les marquages sont plus net.

Les résultats préliminaires obtenus lors de cette étude devront être validés par des répétitions biologiques afin d'appréhender les variations présentes d'une plante à une autre.

Cette analyse *Reverse Northern* devra donc être poursuivie notamment pour l'étude :

- des effets d'un inhibiteur de l'action de l'éthylène, le 1-MCP

- du rôle de la blessure
- de la régulation d'au moins un autre génotype à métabolisme contrasté (PB217 ou RRIM 600).

Ces travaux devraient conduire à une meilleure compréhension du rôle de l'éthylène dans la production de latex et l'induction de la sénescence à travers l'identification précoce des gènes précédemment cités.

Bien que peu de clones issus des banques SSH constituent la collection d'unigènes (158 EST / 1158 clones), leur niveau de réponse à l'éthylène constitue un élément de qualité déterminant pour approfondir leur régulation fine.

Tout d'abord les RT ont été réalisées à partir de 1µg d'ARNtot mais l'hybridation était très faible ou inexistante, c'est pour cette raison que les RT ont ensuite été réalisées à partir de 5µg d'ARN. Lors des RT certains ARNtot n'étaient pas assez concentrés et le volume disponible trop faible pour obtenir les 5µg d'ARN nécessaires à la synthèse des ADNc (5µg d'ARNtot car les ARN poly-A, qui servent de matrice à la synthèse des ADNc, ne représentent que 1% à 3% des ARN totaux. Certains ARN étaient de mauvaise qualité, dégradés ou insuffisamment purifiés (présence d'inhibiteurs de la RT).

BIBLIOGRAPHIE

- Alonso J. M. and Stepanova A. N.** (2004) The Ethylene signalling pathway. *Science* Vol.306: 1513-1515.
- Auzac J., Jacob J.L., Prevot J.C., Clement A., Gallois R., Chrestin H., Lacote R., Pujade-Renaud V. and Gohet E.** (1997) The regulation of *cis*-polyisoprene production (natural rubber) from *Hevea Brasiliensis*.
- Auzac J, Prévôt JC, Jacob JL** (1995) What's new about lutoids? A vacuolar from. *Hevea Brasiliensis*. *Plant Physiol, biochem*, 33 (6): 765-777.
- Gavidia I, Perez-Bermudez P, Seitz HU.** (2002) Cloning and expression of two novel aldo-keto reductases from *Digitalis purpurea* leaves. *Eur J Biochem*, 269(12): 2842-2850.
- Gebelin** (2006) Rapport de stage de Master 2 professionnel effectué au CIRAD intitulé: « Etude de l'expression de gènes impliqués dans la tolérance au stress oxydatif chez *Hevea brasiliensis* en réponse à différents traitements ».
- Gidrol X, Chrestin H, Tan Hui-Lang, Kush A** (1994) Hevein, a lectin-like proteine from *Hevea Brasiliensis* (*rubber tree*) is involved in the coagulation of latex. *The journal of biological chemistry*, vol. 269, No.12: 9278-9283.
- Guo Hongwei and Ecker J.R.** (2004) The ethylene signalling pathway: new insights. *Current Opinion in Plant Biology*, 7: 40-49.
- Jacob JL, Prévôt JC, Auzac J, Pujade-Renaud V, Lacote R, Gohet E, Clément A, Gallois R, Joet T** (1998) Les mécanismes biologiques de la production de caoutchouc par *Hevea brasiliensis*. *Plantation, recherche, développement*, Janvier- Février : 5-13.
- Jacob JL, Prévôt JC, Auzac J, Serrier JB** (1995) *Une usine à caoutchouc naturel: L'Hévéa. La recherche* No.276, Vol.26: 538-545.
- Jacob JL, Prévôt JC, Lacrotte R** (1994), *L'encoche sèche chez Hevea Brasiliensis. Plantation, recherche, développement, novembre- décembre* : 15-24.
- Kevin L.-C. Wang, Hai LI, and Joseph R. Ecker** (2002) Ethylene Biosynthesis and Signaling Networks. *The Plant Cell*, S131-S151.
- Kush Anil** (1994) Isoprenoid biosynthesis: the *Hevea* factory! *Plant Physiol, biochem*, 32 (6): 761-767.

- Lu S, Zhou Y, Li L, Chiang VL.** (2006) Distinct Roles of Cinnamate 4-Hydroxylase Genes in Populus. *Plant Cell Physiol.* May 23.
- Mooibroeck H. and Cornish K.** (2000). Alternative sources of natural rubber. *Appl Microbiol Biotechnol* 53:355-365.
- Nagegowda D.A., Bach T.J. and CHYE Meen-len** (2004) *Brassica juncea* 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA synthase1: expression and characterization of recombinant wild-type and mutant enzymes. *Biochem. J.*, 383, 517-527.
- Pih KT, Yi MJ, Liang YS, Shin BJ, Cho MJ, Hwang I, Son D.** (2000) Molecular cloning and targeting of a fibrillarlin homolog from Arabidopsis. *Plant Physiol.*123(1):51-8.
- Pujade-Renaud V., A. Clément, C. Perrot- REchenmann, J.C. Prévot, H. Chrestin, J.L. Jacob, and J. Guern.** (1994) Ethylene-Induced Increase in glutamine Synthetase Activity and mRNA Levels in Hevea Brasiliensis Latex Cells. *Plant Physiol*, 105:127-132.
- Ross S., Giglione C., Pierre M., Espagne C., and Meinel T.** (2005) Functional and Developmental Impact of Cytosolic Protein N-Terminal Methionine Excision in Arabidopsis. *Plant Physiology* 107: 623-637.
- Romano G.N., A. Edvardsson, A. V. Ruban, Andersson B., Vener A.V., Gray J.E., and Horton P.** (2004) Arabidopsis AtCYP20-2 Is a Light-Regulated Cyclophilin-Type Peptidyl-Prolyl cis-trans Isomerase Associated with the Photosynthetic Membranes. 134:1244-1247.

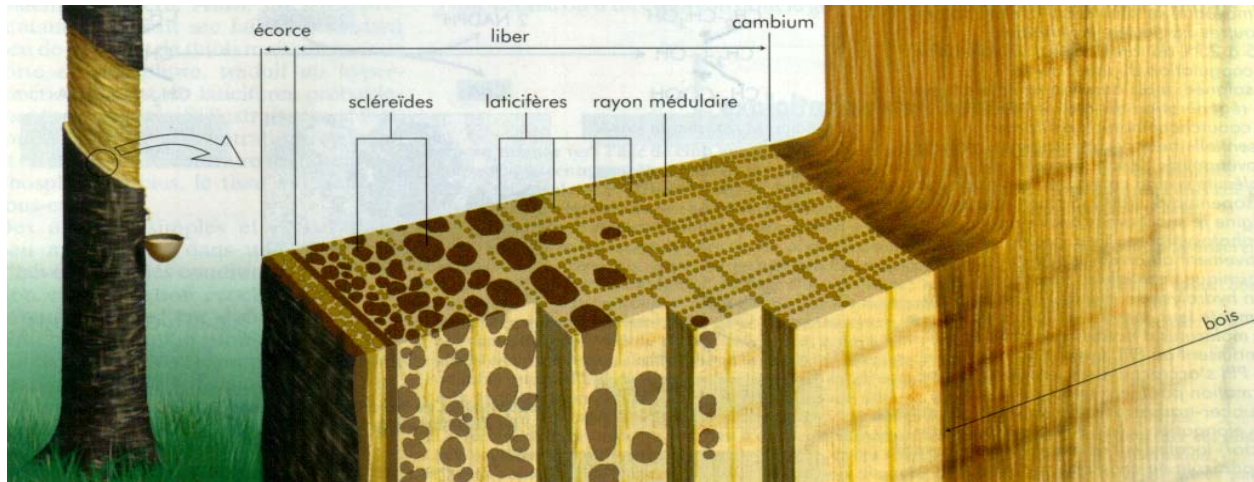


Figure 1. Schéma d'une coupe d'un tronc d'hévéa. (de Faÿ and Jacob, 1989)

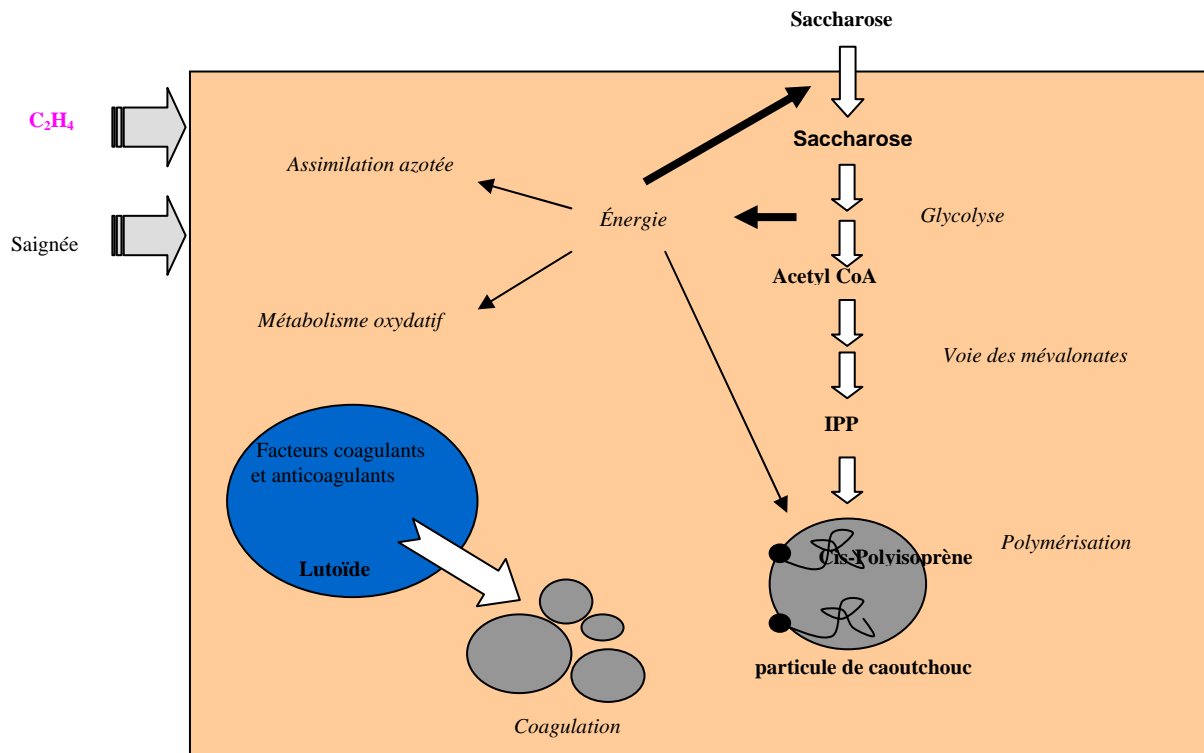


Figure 2. Schéma de biosynthèse du caoutchouc

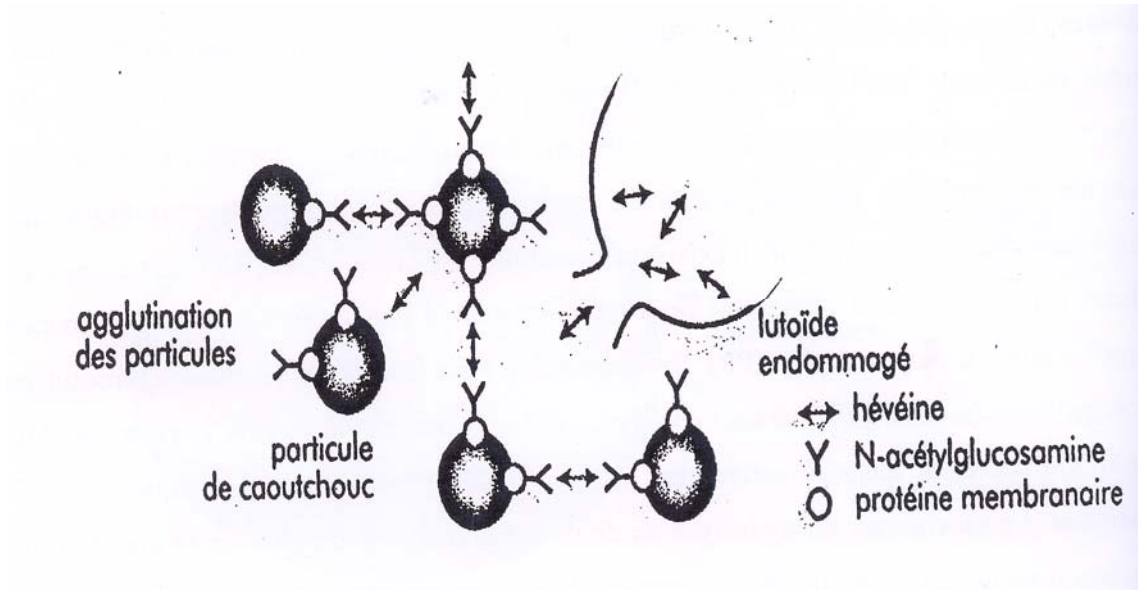


Figure 3. Un des mécanismes responsables de la coagulation du caoutchouc. (Auzac et al. 1997)

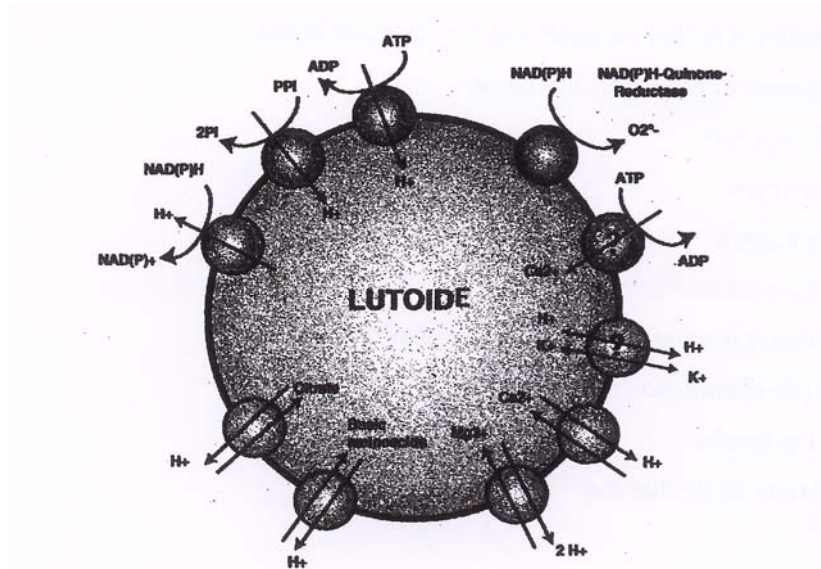


Figure 4. Schéma d'un lutoïde, organite présent au niveau du latex. A ça surface se trouve de nombreux systèmes de transports permettant l'homéostasie du système laticifère. (Auzac et al. 1997)

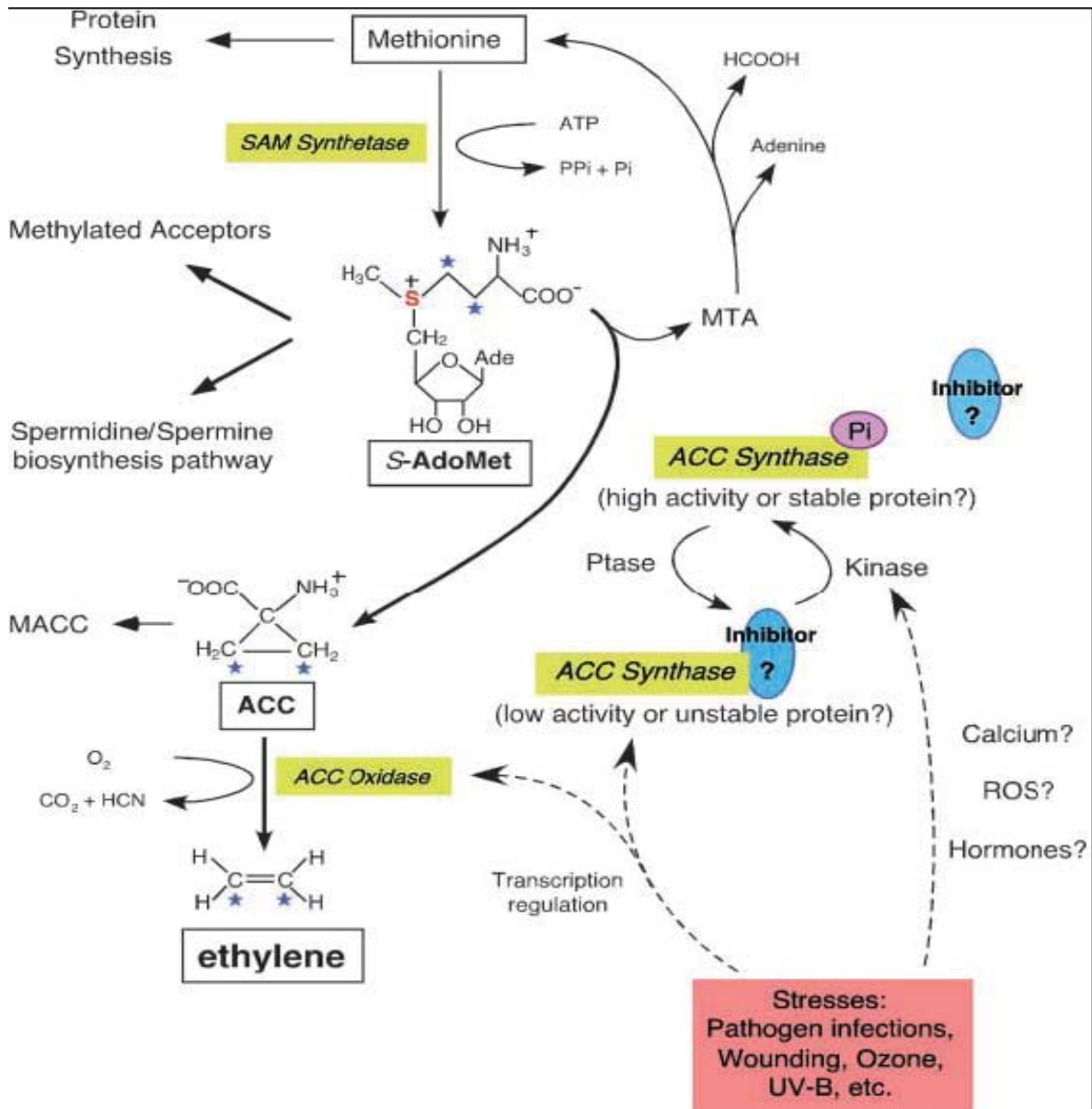


Figure 5. Voie de biosynthèse et régulation de l'éthylène. (Wang et al. 2002)

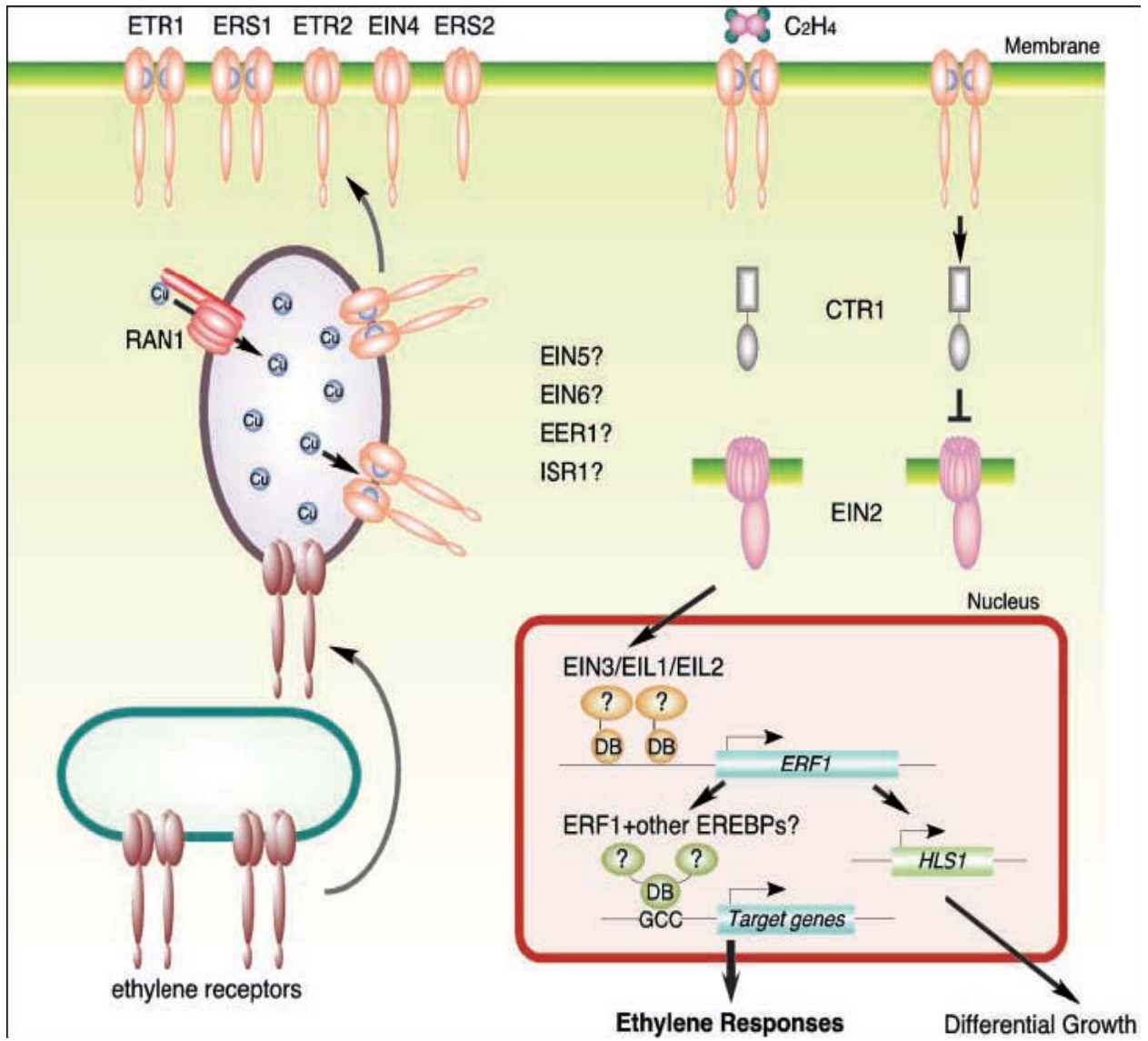


Figure 6. Modèle de la voie de transduction du signal éthylène. (Wang et al. 2002)

Numéro	Plasmide	Amorces	Nb de gènes
1	pCR 2.1	M13-T7	4
2	pMOS-Blue	T7-U19	14
3	pBS-SK	T7-T3	1
4	pBK-CMV	T7-T3	1
5	pUC 19	M13F-M13R	1
6	pGEM-Teasy	T7-SP6	10

Tableau 1. Liste des vecteurs ayant servis au clonage des EST

Etapes	Températures	Temps	Nb de cycles	Fonction
1	94°C	4 min	1	Dénaturation initiale
2	94°C	30 sec	35	Dénaturation
3	52°C	45 sec	35	Hybridation des amorces
4	72°C	3 min	35	Elongation
5	72°C	8 min	1	Elongation terminale
6	15°C	infinie	1	Conservation

Tableau 2. Programmation des machines PCR

	1 → 12		13 → 24		
A	A1 plaque1	A12 plaque 1	A1 plaque1		A12 plaque 1
	A1 plaque2	A12 plaque 2	A1 plaque2		A12 plaque 2
	B1 plaque 1	B12 plaque 1	B1 plaque 1		B12 plaque 1
	B1 plaque 2	B12 plaque 2	B1 plaque 2		B12 plaque 2
P	C1 plaque 1	C12 plaque 1	C1 plaque 1		C12 plaque 1

Tableau 3. Organisation des plaques 96 puits numéro 1 et 2 au niveau de la plaque 384 puits.

Liste des ESTs collectés sur la plaque 96 puits numéro 1

N° accession	Fonctions	Tailles (pb)		N° accessions	Fonctions	Tailles (pb)	
		Insert	Produits PCR			Insert	Produits PCR
E126	Actine		75	041206CecileG07	acyl carrier protein 1	301	476
E...(Hb-EF1alpha (G2))	EF1-alpha	1020	1195	HB0_24Q2_01-A14	ABC transporter-like protein	231	436
pUC19-Hevein	Hévéine	1000	1105	HB0_24Q2_01-I22	Pas de Hit	397	572
Heva	Hevamine B	423	572	041206CecileG09	flavone 3-hydroxylase	476	651
QHb16	Chitinase	160	309	041206CecileH03	acidic ribosomal protein P0	181	356
Hglu	Hevea latex b-1,3-glucanase	975	1124	041206CecileH10	G subunit of vacuolar-type H+ ATPase	354	529
Pbs HbGS 1.6	Glutamine synthétase GS	1500	1664	HB24_0_Q2_02-A11	germin-like protein GLP	341	516
pMOS (3'GS1)	Glutamine synthétase 3' GS1	278	427	HB24_0_Q2_02-A16	GMFP5 [Glycine max]	352	527
pMOS (3'GS2)	Glutamine synthétase 3' GS2	305	454	HB24_0_Q2_02-A21	putative calmodulin	262	437
Hmg-1	Hmg 1	454	603	HB24_0_Q2_02-A24	putative 60s ribosomal protein	371	546
Hmg-2	Hmg 2	226	375	HB24_0_Q2_02-C11	70 kDa heat shock cognate protein 2	182	357
Hmg-3	Hmg 3	286	435	HB24_0_Q2_02-D02	translationally controlled tumor protein	308	483
pMOS-(201-REF)	SRPP (PDF22) zone d'homologie REF	266	415	HB24_0_Q2_02-E04	putative plastidic aldolase	439	614
pMOS-(201-PvSRP)	SRPP (PDF22) zone d'homologie PvSRP	156	305	HB24_0_Q2_02-E05	translation elongation factor eEF-1	212	387
pMOS-(3' 201)	SRPP (PDF22) zone 3' non codante	143	292	HB24_0_Q2_02-E09	elongation factor 1-alpha	256	431
pMOS-GT-REF	Rubber Elongation Factor	500	649	HB24_0_Q2_02-E12	gene product [Oryza sativa]	164	339
pMOS Mn-SOD	Mn SOD Exon 1	294	443	HB24_0_Q2_02-E15	adenine nucleotide translocator	243	418
pCAT 9.5.1.1	Catalase	1700	1864	HB24_0_Q2_02-G07	ubiquitin-conjugating enzyme	303	478
pMOS-GR1	Glutathion réductase	400	549	HB24_0_Q2_02-G09	auxin-repressed protein-like protein	341	516
HVA5	Methionine aminopeptidase (MAP)		149	HB24_0_Q2_02-I14	hypothetical protein	481	656
E 115	HbGCL cyt	1700	1880	HB24_0_Q2_02-I15	BTF3b-like transcription factor	228	403
E 116	HbGCL chloro	1700	1880	HB24_0_Q2_02-I24	Pas de Hit	119	294
E 17 (clone 10.1.1)	CuZn-SOD	700	880	HB24_0_Q2_02-J09	elongation factor 1 alpha	169	344
E 133	HbACS-E4	1002	1177	HB24_0_Q2_02-J22	ribosomal protein L2	236	411
E130	HbACS-F2	486	661	HB24_0_Q2_02-K14	proline-rich cell wall protein -	223	398
E 132	HbACS-F3	660	835	HB24_0_Q2_02-M11	adenosylhomocysteinase	646	821
E 137	HbACS-D10	1129	1304	HB24_0_Q2_02-M13	major latex-like protein	291	466
E 145	HbACS-F10	466	641	HB24_0_Q2_02-M22	Pas de Hit	258	433
E 62	HbACO-H4	1174	1349	HB24_0_Q2_02-N07	putative 60s ribosomal protein	401	576
E 14	HbACO-H5	1115	1290	HB24_0_Q2_02-N19	Prunus dulcis unknown mRNA	243	418
E 23	HbACO-O48	1352	1527	HB24_0_Q2_02-O11	Pas de Hit	145	320
041206CecileA04	heat-shock protein 80	247	422	HB24_0_Q2_02-O20	80S ribosomal protein L31	241	416
HB0_24Q2_01-A13	Pas de Hit	203	378	HB24_0_Q2_02-O24	40S ribosomal protein S13	210	385
HB0_24Q2_01-A17	Pas de Hit	214	389	HB24_0_Q2_02-P21	Pas de Hit	162	337
HB0_24Q2_01-B01	putative cytochrome c oxidase	283	458	HB24_0_Q2_03-A13	60S ribosomal protein L2	207	382
HB0_24Q2_01-B04	Pas de Hit	226	401	HB24_0_Q2_03-A23	Pas de Hit	259	434
041206CecileA10	ubiquitin-ribosomal protein fusion	229	404	HB24_0_Q2_03-B02	Pas de Hit	117	292
041206CecileC08	ribulose 1,5-biphosphate carboxylase	141	316	HB24_0_Q2_03-B04	Pas de Hit	117	292
041206CecileD01	lipid transfer protein precursor	614	789	HB24_0_Q2_03-B12	Pas de Hit	198	373
HB0_24Q2_01-F24	Pas de Hit	220	395	HB24_0_Q2_03-B17	putative epimerase/dehydratase	699	874
041206CecileD08	ubiquitin conjugating protein	423	598	HB24_0_Q2_03-B18	Pas de Hit	128	303
041206CecileE10	protein expresses in S phase	348	523	HB24_0_Q2_03-B21	Pas de Hit	120	295
HB0_24Q2_01-F21	Pas de Hit	206	381	HB24_0_Q2_03-B22	putative 60s ribosomal protein I27a	415	590
041206CecileF01	nucléoside diphosphate kinase	197	372	HB24_0_Q2_03-C11	germin-like protein GLP [Manihot esculenta]	347	522
041206CecileG01	putative germin E protein precursor	599	774	HB24_0_Q2_03-C12	germin-like protein GLP [Manihot esculenta]	361	536
HB0_24Q2_01-G10	majior latex-like protein	290	465				

Tableau 4a. Collection d'ESTs d'*Hevea brasiliensis* organisé dans 2 plaques 96 puits. Sur la plaque N°1 sont présents les gènes de références disponibles au laboratoire (les 31 premières EST) ainsi que les gènes potentiellement sous-exprimés (banque SSH₀₋₂₄ ; témoin-Ethrel®) et quelques gènes potentiellement sur-exprimés (banque SSH₂₄₋₀ ; Ethrel®-témoin). Au niveau de ce tableau sont répertoriés les numéros d'accessions des gènes, leur fonction putative ainsi que la taille des inserts et la taille des produits PCR attendus (insert + partie du plasmide)

Liste des ESTs collectés sur la plaque 96 puits numéro 2

N° accessions	Fonctions	Tailles (pb)		N° accessions	Fonctions	Tailles (pb)	
		Insert	Produits PCR			Insert	Produits PCR
HB24_0_Q2_03-C15	Pas de Hit	435	610	HB24_0_Q2_03-P15	putative DNA polymerase	453	628
HB24_0_Q2_03-C22	glutamine synthetase [Hevea brasiliensis]	266	441	HB24_0Q2_01-A04	vulgaris mitochondrial genomic DNA	126	301
HB24_0_Q2_03-D04	phloem beta-cyanoalanine synthase mRNA	255	430	HB24_0Q2_01-A05	Pas de Hit	154	329
HB24_0_Q2_03-D05	elongation factor 1-alpha	744	919	HB24_0Q2_01-A07	multidrug transporter-like protein	408	583
HB24_0_Q2_03-D08	peptidylprolyl isomerase [Betula pendula]	249	424	HB24_0Q2_01-B05	putative 60S ribosomal protein L38	160	335
HB24_0_Q2_03-E02	OSJNBb0118P14.8 [Oryza sativa]	512	687	HB24_0Q2_01-B08	60S ribosomal protein L12	439	614
HB24_0_Q2_03-E09	ribosomal protein YL16	470	645	HB24_0Q2_01-B11	putative aldo/keto reductase	427	602
HB24_0_Q2_03-E14	BTF3b-like transcription factor	279	454	HB24_0Q2_01-B14	40S ribosomal protein S5	184	359
HB24_0_Q2_03-E20	unknown [Arabidopsis thaliana]	476	651	HB24_0Q2_01-B15	QM family protein [Caragana jubata]	262	437
HB24_0_Q2_03-E23	triose phosphate isomerase cytosolic isoform	336	511	HB24_0Q2_01-D07	dnaK-type molecular chaperone HSP80	315	490
HB24_0_Q2_03-F03	ly200 protein [Capsicum annuum]	203	378	HB24_0Q2_01-D24	S-adenosylmethionine-like protein	269	444
HB24_0_Q2_03-F07	40S ribosomal protein S11 [Euphorbia esula]	386	561	HB24_0Q2_01-E17	acidic ribosomal protein P0	329	504
HB24_0_Q2_03-F19	actin [Vitis labrusca x Vitis vinifera]	554	729	HB24_0Q2_01-E23	Oryza sativa genomic DNA, chromoso	152	327
HB24_0_Q2_03-F22	stem cambial region actin protein	365	540	HB24_0Q2_01-G08	ATP/ADP translocator [Oryza sativa]	162	337
HB24_0_Q2_03-F24	Pas de Hit	116	291	HB24_0Q2_01-G12	Pas de Hit	111	286
HB24_0_Q2_03-G08	putative AAA family ATPase [Oryza sativa]	390	565	HB24_0Q2_01-G17	ribosomal protein L2	236	411
HB24_0_Q2_03-G18	tnpX unnamed protein product	496	671	HB24_0Q2_01-G24	cyclophilin peptidylprolyl isomerase	167	342
HB24_0_Q2_03-G22	40S ribosomal protein S15 [Elaeis oleifera]	423	598	HB24_0Q2_01-H06	conjugal transfer protein	276	451
HB24_0_Q2_03-H07	NIT4A [Lupinus angustifolius]	262	437	HB24_0Q2_01-H22	Tobacco RNA-binding glycine-rich protein	390	565
HB24_0_Q2_03-H09	putative cinnamyl alcohol dehydrogenase	302	477	HB24_0Q2_01-I13	putative SOH1 protein	257	432
HB24_0_Q2_03-H13	60S ribosomal protein L6 (YL16-like)	345	520	HB24_0Q2_01-J03	putative dioxygenase [Solanum demissum]	261	436
HB24_0_Q2_03-H15	MtN4 [Medicago truncatula]	446	621	HB24_0Q2_01-J20	BRI1-KD interacting protein 108	232	407
HB24_0_Q2_03-H24	60S ribosomal protein L10 (QM protein-like)	369	544	HB24_0Q2_01-J23	cell wall-plasma membrane linker protein	454	629
HB24_0_Q2_03-I02	Pas de Hit	293	468	HB24_0Q2_01-K12	EF1A_SOYBN ELONGATION FACTOR	197	372
HB24_0_Q2_03-I11	ADP-ribosylation factor [Capsicum annuum]	295	470	HB24_0Q2_01-K13	F21D18.11 [Arabidopsis thaliana]	410	585
HB24_0_Q2_03-I17	putative 60S ribosomal protein L22	?	#VALEUR!	HB24_0Q2_01-K15	G beta-like protein [Glycine max]	437	612
HB24_0_Q2_03-J23	ascorbate peroxidase [Hevea brasiliensis]	630	805	HB24_0Q2_01-L05	eukaryotic translation initiation factor	190	365
HB24_0_Q2_03-J24	ubiquitin-like protein [Oryza sativa]	225	400	HB24_0Q2_01-L15	unknown protein [Oryza sativa]	197	372
HB24_0_Q2_03-K05	cinnamate 4-hydroxylase	195	370	HB24_0Q2_01-L16	Pas de Hit	428	603
HB24_0_Q2_03-K06	hypothetical protein [Oryza sativa]	269	444	HB24_0Q2_01-M01	60S acidic ribosomal protein PO	205	380
HB24_0_Q2_03-K12	putative protein [Arabidopsis thaliana]	426	601	HB24_0Q2_01-M10	s-adenosylmethionine synthetase	268	443
HB24_0_Q2_03-K20	putative TCP chaperonin family protein	562	737	HB24_0Q2_01-M14	translation initiation factor nps45	285	460
HB24_0_Q2_03-K21	Oryza sativa chromosome 5 clone OJ	193	368	HB24_0Q2_01-M17	40S ribosomal protein S30-like	192	367
HB24_0_Q2_03-K24	Pas de Hit	283	458	HB24_0Q2_01-N01	ribosomal protein L13a [Triticum aestivum]	162	337
HB24_0_Q2_03-L03	putative ribosomal protein [Oryza sativa]	440	615	HB24_0Q2_01-N05	heat shock protein 70 cognate	254	429
HB24_0_Q2_03-L08	fibrillar-like [Arabidopsis thaliana]	515	690	HB24_0Q2_01-N12	phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase	484	659
HB24_0_Q2_03-L09	heat shock protein 90 [Nicotiana tabacum]	207	382	HB24_0Q2_01-O19	novel cap-binding protein nCBP	210	385
HB24_0_Q2_03-L19	elongation factor 1-alpha 1 [Elaeis guineensis]	573	748	HB24_0Q2_01-O22	heat shock protein 70 [Saussurea medusa]	173	348
HB24_0_Q2_03-M12	cyclophilin peptidylprolyl isomerase CYP5	578	753	HB24_0Q2_01-O24	Oryza sativa genomic DNA, chromoso	98	273
HB24_0_Q2_03-M21	elongation factor 1-alpha 1 [Elaeis guineensis]	248	423	HB24_0Q2_01-P05	putative ubiquitin-conjugating enzyme	414	589
HB24_0_Q2_03-N10	ribosomal protein S19	166	341	HB24_0Q2_01-P07	defensin protein precursor	236	411
HB24_0_Q2_03-N12	40S ribosomal protein S16	343	518	HB24_0Q2_01-P11	transcription factor	380	555
HB24_0_Q2_03-O02	aquaporin-like protein	225	400	HB24_0Q2_01-P14	translational elongation factor 1	284	459
HB24_0_Q2_03-O14	At5g27410/F21A20_120	596	771	HB24_0Q2_01-P19	elongation factor 1-alpha 1	266	441
HB24_0_Q2_03-O18	DnaJ-like protein	576	751	HB24_0Q2_01-P22	NADPH-dependent codeinone reductase	169	344

Tableau 4b. Collection des EST sélectionnés au sein de deux plaques 96 puits. Sur la plaque N°2 sont présents uniquement des gènes potentiellement sur-exprimés issues de la banque SSH₂₄₋₀. Au niveau de ce tableau sont répertoriés les numéros d'accension des gènes, leur fonction putative ainsi que la taille des inserts et la taille des produits PCR attendus (insert + partie du plasmide)

N° plaques	Clones EST	Clones amplifiés - nombre (%)			
		Total clones	Sans produits	simples bandes	doubles bandes
1	92	83 (90%)	9 (10%)	73 (79%)	10 (11%)
2	91	81 (89%)	10 (11%)	72 (79%)	9 (10%)

Tableau 5. Profil des amplifications par PCR des 189 EST. Les réactions ont données soit aucune, soit 1 produit PCR (1 bande au niveau du gel d'agarose), soit 2 produits PCR (2 bandes au niveau du gel d'agarose). Ces produits sont issus des 6 réactions PCR indépendantes réalisées sur les 189 unigènes présents sur 2 plaques 96 puits sélectionnés pour cette étude. Ce tableau permet de quantifier le pourcentage de gènes pour qui l'amplification s'est bien ou mal déroulé.

EST	Niveau d'expression	Traitements	
		8h	24h
Sur-exprimés (stimulés/contrôle)	2-5 X	36	38
	5-10 X	26	26
	10-50 X	16	27
	50-100 X	2	1
	100-200 X	0	2
	Totale	80	94
Sous-exprimés (contrôle/stimulé)	0 à 0,5X	2	4
Nombre total d'ESTs étudiées		189	189

Tableau 6. Répartition des gènes en fonction de leur niveau d'expression observé par *Reverse Northern* dans des feuilles du clone PB260 après 8h et 24h de stimulation éthylénique à 1ppm. Les gènes sur-exprimés sont classés par rapport au nombre de fois qu'ils sont plus exprimés que le témoin (jeune plant d'hévéa n'ayant subi aucun traitement), entre 2 et 200 fois.

Origine banque SSH	Total EST	Nombres de gènes répondants à une stimulation de 24h à l'éthylène	
		Sous-exprimés (<0,5 X)	Sur-exprimés (>2X)
Banque SSH ₀₋₂₄	24	2	1
Banque SSH ₂₄₋₀	134	4	61

Tableau 7. Comparaison des niveaux d'expressions des gènes observés par *Reverse Northern* suivant l'origine des banque SSH, banque SSH₀₋₂₄ (contrôle-stimulé) et banque SSH₂₄₋₀ (stimulés-contrôle). Les gènes issus de la banque SSH₀₋₂₄ devraient être sous-exprimés alors que les gènes issus de la banque SSH₂₄₋₀ devraient être des gènes sur-exprimés.

	Total gènes	Nombres de gènes répondant à la stimulation éthylénique					
		8h après traitement			24h après traitement		
		Sous-exprimés	Sur-exprimés		Sous-exprimés	Sur-exprimés	
		<0,5X	>2X	>10X	<0,5X	>2X	>10X
Métabolisme laticifère	16	0	4	0	0	12	5
Stress oxydatif	7	0	3	0	0	6	4
Biosynthèse de l'éthylène	8	0	6	2	0	8	4
Gènes de réponse à l'éthylène (banques SSH)	158	2	67	16	4	68	14
Total	189	2	80	18	4	94	27

Tableau 8. Les gènes sur-exprimés sont séparés en deux catégories, les gènes surexprimés au moins 2 fois par rapport à un témoin non stimulé et les gènes sur-exprimés au moins 10 fois par rapport au témoin non stimulé par l'éthylène pendant 8h et 24h chez des feuilles de PB260. Ce tableau permet d'identifier les proportion d'expression des différentes familles de gènes impliqués dans la biosynthèse du caoutchouc et du latex (métabolisme laticifère), dans la détoxification des radicaux libre (stress oxydatif), dans la biosynthèse de l'éthylène et enfin dans les 2 banques SSH₀₋₂₄ et SSH₂₄₋₀ (gènes de réponse à l'éthylène).

N° accession	Fonctions	Traitement (h)	Validation
E 23	HbACO-048	8	OUI
HB24_0_Q2_02-O11	Pas de Hit	8	ND
HB24_0_Q2_03-O14	At5g27410/F21A20_120 [Arabidopsis thaliana]	8	ND
041206CecileH03	acidic ribosomal protein P0	8	ND
HB0_24Q2_01-G10	major latex-like protein	8	ND
HB24_0_Q2_03-E09	ribosomal protein YL16	8	ND
HB24_0_Q2_03-M12	cyclophilin [Arabidopsis thaliana] peptidylprolyl isomerase	8	ND
HB24_0_Q2_03-I02	Pas de Hit	24	ND
E130	HbACS-F2	24	OUI
E 132	HbACS-F3	24	OUI
HB24_0_Q2_03-G22	40S ribosomal protein S15	24	ND
Hmg-2	Hmg 2	24	OUI
E 137	HbACS-D10	24	OUI
HB24_0_Q2_03-J23	ascorbate peroxidase [Hevea brasiliensis]	24	ND
Heva	Hevamine B	24	OUI
Hmg-3	Hmg 3	24	OUI
HVA5	Methionine aminopeptidase (MAP)	24	OUI
HB24_0Q2_01-E23	genomic DNA, chromoso	24	ND
HB24_0_Q2_03-J24	ubiquitin-like protein	24	ND
HB24_0_Q2_03-K05	cinnamate 4-hydroxylase	24	ND
HB24_0_Q2_03-O18	DnaJ-like protein [Arabidopsis thaliana]	24	ND
QHb16	Chitinase	24	OUI
E 115	HbGCL cyt	24	OUI
E 116	HbGCL chloro	24	OUI
HB24_0_Q2_03-K06	hypothetical protein	24	ND
pUC19-Hevein	Hévéine	24	OUI
pMOS-GR1	Glutathion réductase	24	OUI
E 133	HbACS-E4	8 et 24	OUI
HB24_0_Q2_03-L09	heat shock protein 90	8 et 24	ND
HB24_0Q2_01-A04	vulgaris mitochondrial genomic DNA	8 et 24	ND
HB24_0Q2_01-B11	putative aldo/keto reductase	8 et 24	ND
HB24_0_Q2_03-K20	putative TCP- chaperonin family protein	8 et 24	ND
HB24_0Q2_01-B15	QM family protein	8 et 24	ND
HB24_0_Q2_03-L08	fibrillar-like [Arabidopsis thaliana]	8 et 24	ND

Tableau 9. Liste des gènes sur-exprimés au moins 10 fois en réponse à l'éthylène d'éthylène (1ppm) pendant 8h ou 24h par rapport au contrôle non stimulé dans des feuilles de jeune plants greffés du clone PB260. Il est présenté les numéros d'accension des gènes, leur fonction supposés, le temps de traitement ainsi que la validation par RT-PCR semi-quantitative qui à été réalisée antérieurement à cette étude. ND signifie non déterminé, donc que la validation par RT-PCR semi-quantitative n'a pas encore été réalisé sur ces ESTs. La validation signifie que la sur-expression observée par Reverse Northern a été confirmée par RT-PCR semi-quantitative.