

DK 550895

CD-TH 4262

UNIVERSITE  
PAUL  
SABATIER



Géraldine Nemrod  
IUP Bioingénierie  
M2 Biotechnologies appliquées au végétal

TOULOUSE II

**Étude de l'expression de gènes de réponse à  
l'éthylène chez trois clones d'*Hevea brasiliensis***



UMR DAP  
Equipe BURST

Responsable de stage : Pascal Montoro

CIRAD-DIST  
Unité bibliothèque  
Lavalette

Année universitaire : 2007-2008



\*000099916\*



## REMERCIEMENTS

*Je tiens en premier lieu à remercier Pascal Montoro pour m'avoir encadrée tout au long de ce stage. Merci pour la confiance que tu m'as accordée, pour ta disponibilité, ta gentillesse ainsi que tes encouragements. Merci également pour m'avoir toujours reçue avec le sourire.*

*J'aimerais également remercier Julie Leclercq pour sa bonne humeur, sa patience et sa grande gentillesse. Merci pour tes conseils, et pour m'avoir accordé ton temps à chaque fois que j'en avais besoin.*

*J'adresse également tous mes remerciements à Maryannick Rio pour m'avoir accompagnée dans mes premiers pas au sein du laboratoire, pour sa sympathie et puis pour avoir toujours été là pour répondre à mes questions. Merci pour ton aide.*

*Ce fut sincèrement un plaisir de travailler avec vous.*

*Je voudrais aussi remercier l'IFC pour le financement de ce stage.*

*A tout les membres de l'équipe BURST, merci pour votre accueil chaleureux au sein du CIRAD. J'adresse également un grand merci à tous les techniciens, thésards et chercheurs qui ont participé, de près ou de loin, au bon déroulement de ce stage.*

*A Denis Fabre, merci pour tes conseils et l'aide si précieuse que tu m'as apportée au moment où j'en avais tant besoin.*

*Enfin, j'aimerais remercier l'ensemble des stagiaires qui ont largement contribué à faire de ces sept mois un souvenir impérissable. La bonne ambiance et la décoration papier de notre bureau va me manquer.*

**24 AOUT 2009**

# TABLE des MATIERES

<b>I- CONTEXTE ET OBJECTIF</b>	<b>3</b>
<b>II- INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE</b>	<b>4</b>
<b>1) Généralités sur l'hévéa</b>	<b>4</b>
a. Exploitation de l'hévéa	4
b. Importance économique	4
<b>2) Mécanismes de la production de caoutchouc</b>	<b>5</b>
a. Organisation fonctionnelle du tissu sécréteur de l'hévéa	5
b. Composition du latex	5
c. Voie de biosynthèse du caoutchouc	6
<b>3) Exploitation de l'hévéa pour la production de latex</b>	<b>7</b>
a. Stimulation de la production de latex par l'éthéphon	7
b. Problèmes induits par la surexploitation	8
<b>4) L'éthylène chez les végétaux</b>	<b>8</b>
a. Biosynthèse de l'éthylène	8
b. Perception et transduction du signal éthylène (Figure)	9
<b>5) Objectif du stage</b>	<b>9</b>
a. Les études mises en place	9
b. Déroulement du stage	10
<b>III- MATERIEL ET METHODES</b>	<b>13</b>
<b>1) Matériel végétal</b>	<b>13</b>
<b>2) Traitements et applications des stress abiotiques</b>	<b>13</b>
a. La blessure	13
b. Ethylène	13
<b>3) Extraction des ARN totaux et synthèse des ADN complémentaires</b>	<b>13</b>
<b>4) Synthèse des ADN complémentaires simples brins (ADNc)</b>	<b>14</b>
<b>5) Définition des séquences des amorces</b>	<b>14</b>
<b>6) Vérification de la fonctionnalité et de la spécificité des amorces</b>	<b>15</b>
<b>7) Clonage et vérification des produits PCR</b>	<b>15</b>
a. Réamplification par PCR	15
b. Ligation	15
c. Transformation	16
d. Vérification PCR	16
e. Purification du plasmide	16
f. Restriction	16
g. Séquençage	17
<b>8) Analyse d'expression génique par PCR quantitative (Q-PCR)</b>	<b>17</b>
a. Préparation des mélanges réactionnels en plaque 96 puits	17
<b>IV- RESULTATS</b>	<b>18</b>
<b>1) Analyse des différentes sources de variabilité des résultats de Q-PCR</b>	<b>18</b>
a. Analyse de la variabilité au sein des répétitions techniques	18
b. Analyse de la variabilité entre plaques (2 analyses indépendantes)	18
c. Stabilité du gène de ménage	18

d. Analyse de la variabilité au sein des répétitions biologiques	19
e. Impact du génotype et du traitement sur l'expression des différents gènes	19
<b>2) Analyse par Q-PCR de l'expression différentielle de gènes dans les feuilles entre trois clones à métabolisme contrasté</b>	<b>20</b>
a. Aquaporine Like Protein (HbPIP-like)	20
b. Heat Shock Cognate Protein 70 (HbHSCP70)	21
c. HbACSF2	22
<b>3) Analyse de l'expression de facteurs de transcription dans les écorces</b>	<b>22</b>
a. Auxin Repressed Protein (HbARP)	22
b. HbBTF3b-like	23
c. HbTF vicia faba et HbZFP	23
<b>V- DISCUSSION ET CONCLUSION</b>	<b>24</b>
<b>1) Analyse des données d'expression de gènes</b>	<b>24</b>
<b>2) Importance de la variabilité biologique dans les résultats de Q-PCR</b>	<b>24</b>
<b>3) Les sources de variation de l'expression génique</b>	<b>24</b>
<b>4) Comparaison des méthodes d'expression génique</b>	<b>25</b>
<b>5) Variabilité génotypique de la réponse aux stress</b>	<b>25</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	<b>27</b>
<b>ANNEXES</b>	<b>31</b>

## I- CONTEXTE ET OBJECTIF

Le CIRAD (Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement) a été créé en 1984. Sa principale mission consiste à contribuer au développement rural des pays du Sud et de l'outre-mer français, par des recherches et des expérimentations, principalement dans les secteurs agricoles, forestiers et agroalimentaires.

L'équipe de recherche qui m'a accueillie pour ce stage est l'équipe « Biologie cellulaire et moléculaire de la réponse aux stress » (BURST). Elle est incluse dans l'UMR « Développement et Amélioration des Plantes » (DAP). Son objectif majeur est l'amélioration des espèces pérennes pour la tolérance aux stress biotiques et abiotiques. Le projet de l'équipe BURST vise, de ce fait, une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans la réponse aux stress, *via* l'identification de gènes clés et de facteurs génétiques de la tolérance. Ces acquis permettront de participer à la définition de stratégies d'amélioration et de lutte pour les espèces étudiées (caféier et hévéa).

L'institut Français du caoutchouc (IFC), dont la société Michelin fait partie, finance, entre autres, les recherches du programme Biologie du développement de l'hévéa et de la production de caoutchouc naturel effectuées au CIRAD. L'IFC est né à la suite de la signature de l'accord sur la réglementation internationale du caoutchouc en mai 1934. Cette association de planteurs, qui autrefois participait activement à la recherche, ne contribue aujourd'hui à ces travaux qu'en tant que partenaire financier.

Lors de l'exploitation des hévéas, la production de latex est stimulée par des applications périodiques sur l'encoche de saignée d'un mélange générateur d'éthylène dans l'écorce. Cependant, l'emploi sans précaution de ce mélange ainsi que l'intensité de saignée, combinés aux stress environnementaux, peuvent générer un stress oxydatif conduisant à l'arrêt de l'écoulement de latex, voire à la dégénérescence des tissus de l'écorce. Afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires coordonnés par l'éthylène et ainsi de mieux appréhender l'impact d'un tel traitement sur la production de latex, des études ont été mises en place pour identifier les gènes jouant un rôle clé dans la biosynthèse et la régulation de cette hormone végétale. Ce programme de recherche vise ainsi à optimiser le potentiel de production chez l'hévéa sans induire de problèmes de dysfonctionnement cellulaire. C'est dans le cadre de cette problématique que s'inscrit cette étude, qui a pour objectif l'analyse de l'expression de gènes de réponse à l'éthylène.



**Figure 1 : Récolte du latex d'hévéa après saignée**

**Tableau 1 : Les principaux pays producteurs de caoutchouc naturel en 2006 (Source IRSG)**

Pays	Production de caoutchouc (% de la production mondiale)
Thaïlande	33 %
Indonésie	27 %
Malaisie	13 %
Inde	9 %
Vietnam	6 %
Chine	5 %
Côte d'Ivoire	2 %
Sri-Lanka	1 %
Brésil	1 %
Libéria	1 %
Reste du Monde	2 %

## II- INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

### 1) Généralités sur l'hévéa

L'hévéa, de son nom latin *Hevea brasiliensis*, appartient à la famille des *Euphorbiaceae* qui compte près de 6000 espèces. Le genre *Hevea* comprend 10 espèces d'arbres originaires du bassin amazonien, mais *H. brasiliensis* est la seule espèce cultivée. En 1876, le britannique H.A. Wickham transféra 70000 graines d'hévéa du Brésil en Angleterre, où 3% seulement germèrent ; puis les jeunes plants furent transportés en Asie. Cette opération fut à l'origine des plantations d'hévéa asiatiques, qui représentent aujourd'hui 93% de la production mondiale (Jacob, d'Auzac et al. 1995).

Sur quelques 12500 espèces de plantes laticifères, celles produisant du caoutchouc se situeraient aux environs de 7000. Dans la grande majorité des cas, le caoutchouc se trouve mélangé à des quantités plus ou moins importantes de substances résineuses qui déprécient la qualité du caoutchouc. Celui-ci n'est alors utilisable qu'après extraction des résines. Parmi les meilleures espèces à caoutchouc, *Hevea brasiliensis* issu de la forêt amazonienne s'est rapidement révélé le meilleur producteur. Cette espèce s'est confirmée comme la plus apte à être cultivée et exploitée industriellement (Compagnon 1986).

#### *a. Exploitation de l'hévéa*

L'hévéa permet de produire deux produits renouvelables : le bois et le caoutchouc naturel. Ce dernier provient du latex de l'arbre récolté par incision de l'écorce sur une partie de sa circonférence, au niveau des tissus producteurs appelés laticifères. Cette opération est appelée saignée. L'encoche est réalisée de gauche à droite en une diagonale descendante afin de sectionner le maximum de cellules laticifères en suivant leur schéma de différenciation en spirale autour du tronc (Figure 1) (d'Auzac *et al.*, 1997).

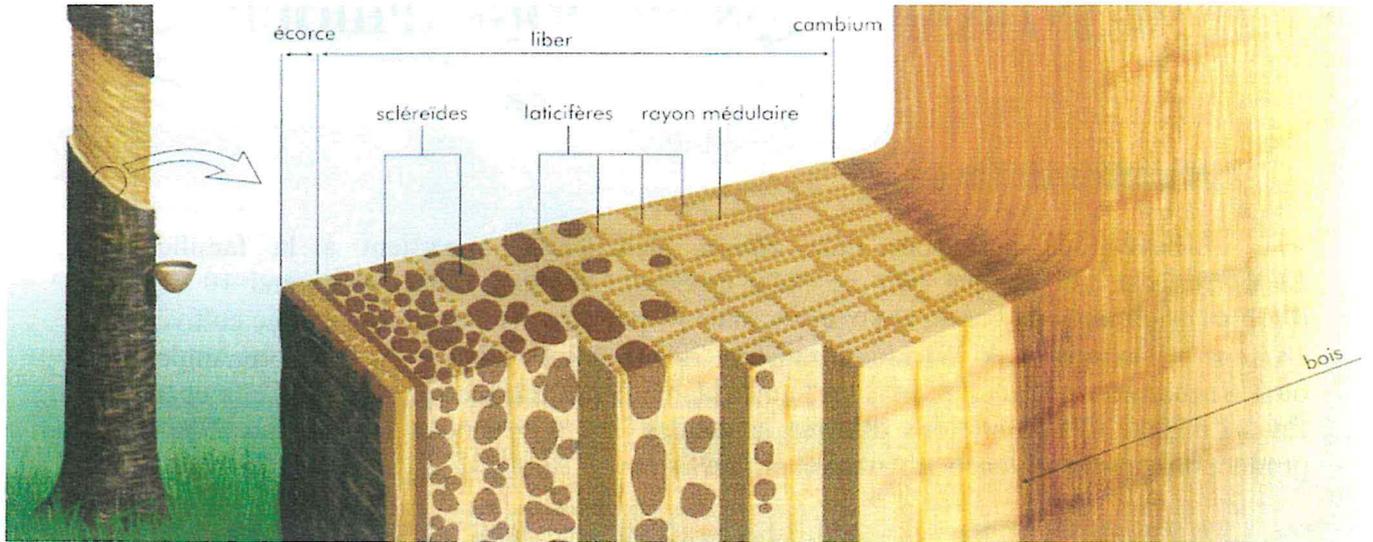
C'est la pression de turgescence qui expulse le latex des laticifères. Celui-ci est alors recueilli dans une tasse disposée là à cet effet. L'écoulement dure deux à trois heures puis est stoppé par la coagulation des particules de caoutchouc *in situ*.

La mise en saignée se fait vers l'âge de cinq ans, puis l'hévéa est exploité pendant vingt-cinq à trente ans. Lors d'une exploitation normale, la saignée est pratiquée tous les jours où il ne pleut pas, voire tous les deux jours. Lorsque l'on applique un agent stimulant la production de latex, tel que l'éthéphon, la fréquence de saignée est diminuée à quatre fois par quinzaine. Dans tous les cas, la saignée est effectuée le matin de bonne heure afin de favoriser une forte pression de turgescence dans les laticifères et de ce fait l'écoulement de latex.

#### *b. Importance économique*

En 2007, la production mondiale de caoutchouc naturel était de 9,7 millions de tonnes (Source International Rubber Study Group). La Thaïlande était le premier producteur mondial, avec 33% de la production de caoutchouc. En deuxième position se trouvait l'Indonésie avec 27% de la production puis la Malaisie avec 13% (Tableau 1).

Le principal domaine d'emploi des caoutchoucs naturels est celui des pneumatiques, qui représente près de 70% de leur utilisation.



**Figure 2 : Schéma d'une coupe d'un tronc d'hévéa (de Fäy and Jacob 1989)**

Le caoutchouc naturel représente 41,7% du marché du caoutchouc. Il présente certains avantages par rapport au caoutchouc synthétique :

- Il possède des propriétés que le caoutchouc synthétique ne parvient pas à égaler. Il présente notamment une grande résistance à l'usure, à la propagation d'entailles ainsi qu'un faible échauffement interne. Cela le rend incontournable dans la fabrication de certains produits comme les pneumatiques (Compagnon 1986).
- L'hévéaculture utilise le soleil comme source d'énergie renouvelable, par opposition à la fabrication du caoutchouc synthétique qui se fait à partir d'une énergie fossile : le pétrole.
- L'hévéa est moins exigeant que d'autres cultures comme le cacao ou le café et peut s'accommoder de sols dont la fertilité insuffisante ne pourrait convenir à d'autres cultures. Les plantations d'hévéa permettent ainsi de réhabiliter des sols dégradés.
- En plus du caoutchouc, l'hévéaculture fournit également des produits secondaires, tels que son bois, qui peut servir pour la fabrication de bois d'œuvre ou de pâte à papier (Serier et Van Dyk, 1983), ou encore ses graines qui permettent la production d'huile ou de tourteaux pour l'alimentation du bétail.

## 2) Mécanismes de la production de caoutchouc

Le latex est le cytoplasme de cellules spécialisées appelées laticifères (de Fäy et Jacob, 1989 ; Dickenson, 1964). Ces cellules sont présentes dans toutes les parties de l'arbre, des racines jusqu'aux feuilles, en passant par l'écorce du tronc, siège de l'exploitation du latex chez l'hévéa

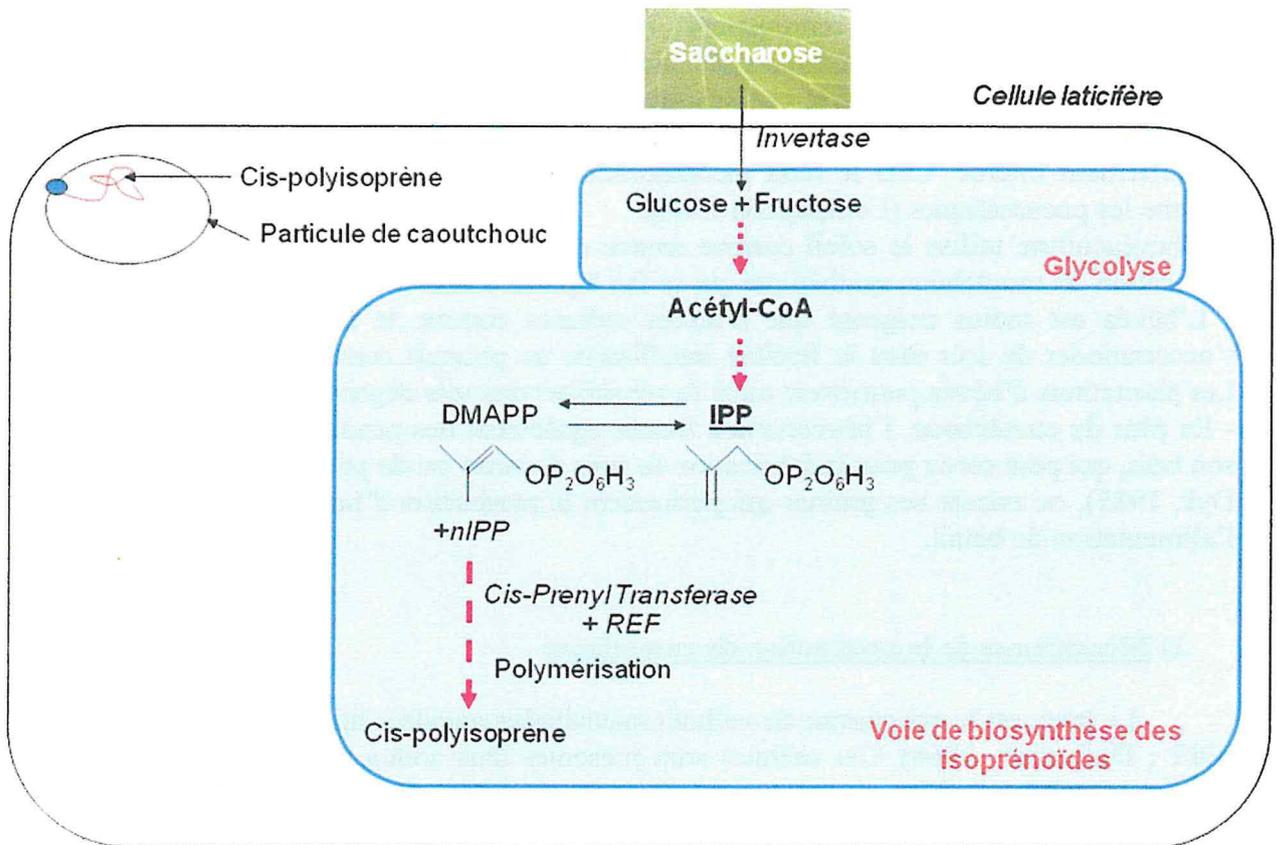
### *a. Organisation fonctionnelle du tissu sécréteur de l'hévéa*

La croissance de l'arbre en épaisseur provient du fonctionnement d'un méristème latéral appelé cambium. Cette assise génératrice est à l'origine, entre autres, de la mise en place de tissus « secondaires » : le bois et le liber (Figure 2). Le bois est mis en place vers l'intérieur du tronc. Il constitue un matériau résistant et contient les vaisseaux du xylème qui conduisent la sève brute (eau et éléments minéraux) des racines vers les feuilles. Le liber, formé vers l'extérieur, est un tissu fragile, en perpétuel remaniement. C'est dans celui-ci que se différencient les cellules laticifères qui vont s'anastomoser pour former des manteaux laticifères. Ces derniers sont disposés en anneaux concentriques correspondant au rythme de leur initiation par le cambium. Au sein d'un même anneau, les parois latérales des cellules sont perforées, mettant ainsi en communication les cellules sécrétrices contiguës (Compagnon 1986).

### *b. Composition du latex*

Le latex contient 25 à 50% de matière sèche. Il est constitué de plusieurs sortes de particules en suspension dans un milieu liquide.

- Les particules de caoutchouc représentent plus de 90% de la matière sèche du latex (Compagnon 1986). Leur surface présente une charge électro négative qui tend à les repousser les unes des autres et à assurer de ce fait la stabilité colloïdale du latex (Southorn et Yip, 1968).
- Les lutoïdes (Homans et Van Gils, 1948) représentent 10 à 20% du volume du latex. Tout comme les particules de caoutchouc, leur charge est négative, ce qui leur confère également un rôle dans la stabilité du latex. Ils contiennent un sérum acide, des cations divalents ( $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ) et des protéines chargées positivement. Ainsi, lorsque ces lutoïdes sont dégradés au



**Figure 3 : Schéma simplifié de la biosynthèse du caoutchouc**

cours de la saignée, ils rejettent leur contenu dans la cellule ce qui va neutraliser les particules de caoutchouc. Ces organites renferment également une protéine en quantités importantes, l'hévéine, qui se lie à un récepteur glycoprotéique localisé à la surface des particules de caoutchouc, conduisant à la formation de ponts et à la coagulation du latex (Gidrol *et al.*, 1994).

- Les particules de Frey-Wyssling (Frey-Wissling, 1929, Dickenson, 1964) sont des organites renfermant des globules composés de lipides et de caroténoïdes responsables de leur couleur jaune-orangé. Ils contiennent également des enzymes, dont la o-diphénol oxydase qui semble jouer un rôle dans coagulation latex. (Hanower *et al.*, 1976 ; Brzozowska *et al.*, 1978).

Les noyaux et les mitochondries ne sont pas décelables dans le latex récolté. Ceux-ci restant accrochés au plasmalemme, ils ne sont pas expulsés lors de la saignée. Le tissu laticifère conserve ainsi sa capacité de fonctionnement et le latex peut être régénéré entre deux saignées.

### c. Voie de biosynthèse du caoutchouc

Le caoutchouc du latex d'hévéa est constitué pour 94% d'une macro-molécule, le  $\beta$ -cis-polyisoprène et pour le reste d'acide gras, de stérols et de protéines (Jacob *et al.*, 1995).

La molécule initiale et essentielle au fonctionnement des cellules laticifères est le saccharose produit par l'activité photosynthétique des feuilles. Celui-ci est transporté activement jusque dans les cellules laticifères par un symport  $H^{+}$ /saccharose nécessitant une activité ATPase pompe à proton (Tupy, 1984).

Schématiquement, l'élaboration du cis-polyisoprène peut être divisée en deux phases distinctes (Jacob *et al.*, 1989 ; Keckwick, 1989) (~~Erreur ! Source du renvoi introuvable.~~): *Figure 3*

- La première étape correspond à la glycolyse. Elle utilise le saccharose pour produire les trois éléments indispensables à la biosynthèse du caoutchouc : l'acétyl-CoA, qui est un précurseur du polymère, de l'énergie sous forme d'ATP ainsi que du pouvoir réducteur sous la forme de co-facteur NADPH.

- La seconde correspond à la voie de biosynthèse des isoprénoïdes. Elle va permettre la formation de pyrophosphate d'isopentényle (PPI) à partir des produits formés lors de la glycolyse. Le PPI est l'unité de base de la polymérisation en cis-polyisoprène. Cependant, celle-ci n'est réalisable qu'en présence d'une molécule « starter », capable d'initier cette polycondensation. Il s'agit du pyrophosphate de diméthylallyle (PP-DMA), isomère du PPI. Les maillons d'IPP s'accrochent ensuite un par un sur le polymère en formation par l'intermédiaire de la cis-Prenyl transférase (Light and Dennis 1989), associée à un facteur d'élongation (REF) localisé sur la membrane entourant la particule de caoutchouc (Dennis and Light 1989). Ces maillons sont intégrés à la molécule uniquement sous configuration *cis* (Bunn, 1942 ; Golub *et al.*, 1962), ce qui lui donne une très grande régularité, à la base des qualités technologiques du caoutchouc naturel.

### 3) Exploitation de l'hévéa pour la production de latex

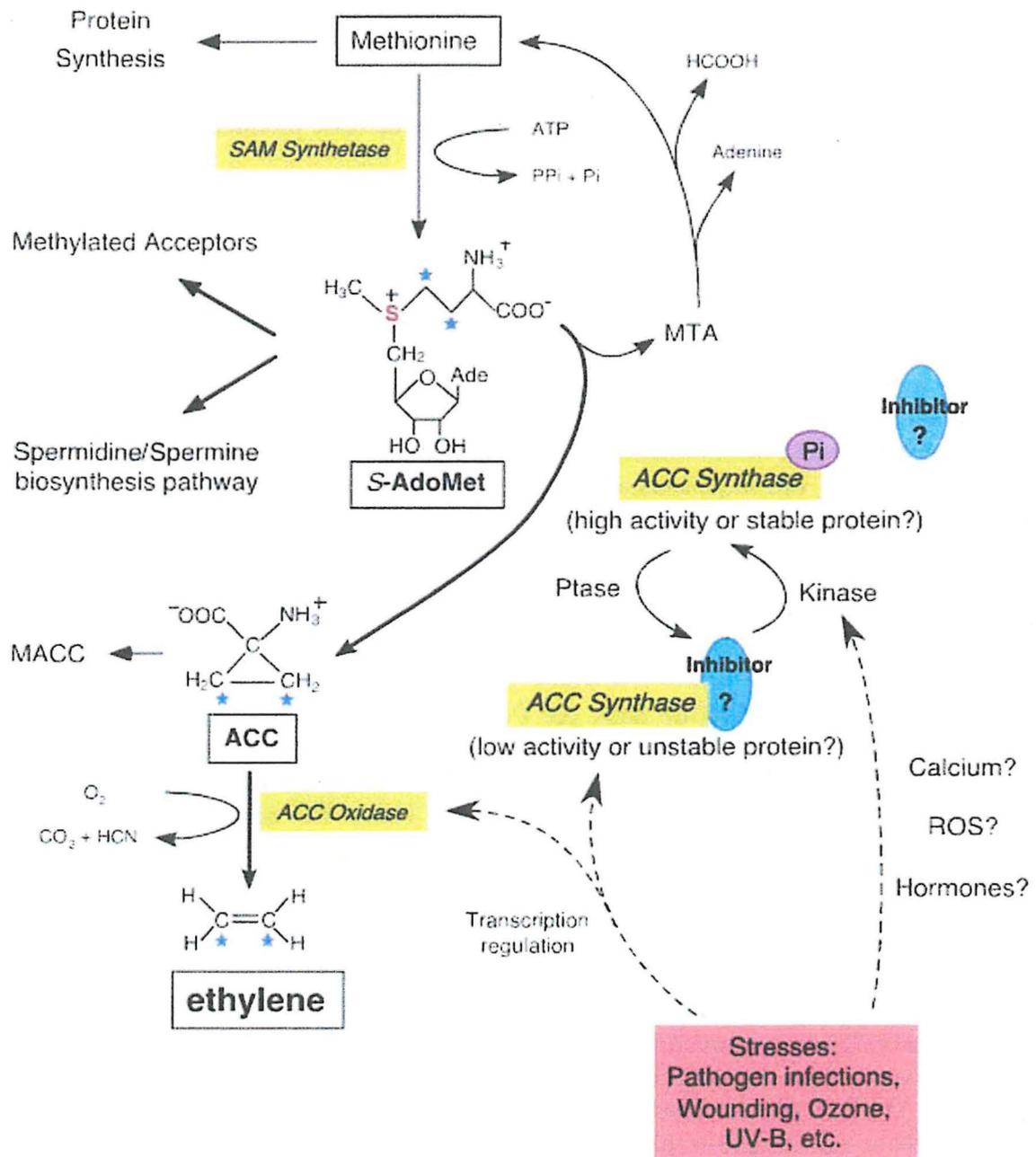
La production de latex après une saignée dépend en premier lieu de sa durée d'écoulement puis dans un deuxième temps de sa capacité à se régénérer entre deux saignées. Ce sont donc les deux facteurs limitants les plus importants de cette production (Compagnon 1986).

#### *a. Stimulation de la production de latex par l'éthéphon*

Depuis plus de 50 ans, de nombreux traitements ont été expérimentés dans le but d'améliorer la production de latex : grattage de l'écorce, injections de produits chimiques dans le tronc (sulfate de cuivre, acide borique), applications d'hormones de synthèse proches de l'auxine sur le panneau de saignée... Tous ces traitements se sont révélés efficaces, à des degrés divers, et induisent au sein de l'arbre la production d'éthylène, hormone de stress chez les plantes et véritable agent de stimulation de la production de latex. Dans les années 70, D. Abraham et J. d'Auzac ont expérimenté un générateur d'éthylène, l'éthéphon (acide 2-chloroéthylphosphonique), qui est aujourd'hui utilisé à l'échelle industrielle comme agent stimulant (Coupé and Chrestin 1989). Deux à douze fois par an, 48 heures avant la saignée, un mélange de ce produit à l'huile de palme est badigeonné sur l'encoche afin d'accroître la production. Le traitement par l'éthéphon stimule de manière efficace la production de latex (d'Auzac and Jacob 1989).

- La stimulation de la production de latex par l'éthéphon permet dans un premier temps d'augmenter la durée de son écoulement. Ainsi elle peut souvent être doublée voire même plus (de Jonge, 1955). Ceci peut s'expliquer par une entrée d'eau dans les cellules laticifères, ce qui entraîne la dilution du latex (Abraham et Tyler, 1967). Par ailleurs la stimulation modifierait la perméabilité de la membrane lutoïdique (Coupé et Lambert, 1977) et améliorerait sa stabilité. Ainsi, le latex d'arbres stimulés coagulerait moins rapidement que celui des contrôles non stimulés. Enfin, l'éthéphon diminuerait l'activité des phénoloxidasés, enzymes clés de la coagulation du latex.

- Dans un deuxième temps, la stimulation permet d'améliorer la régénération du latex en augmentant la biosynthèse de caoutchouc et celle des protéines impliquées dans ce processus. En effet, l'éthéphon entraîne une augmentation du chargement en sucres au sein des laticifères (Lacrotte *et al.*, 1985) et de leur catabolisme, ce qui s'explique par leur utilisation dans la voie de biosynthèse du *cis*-polyisoprène (Tupy et Primot, 1976). La stimulation induit également une augmentation du pH du latex, ce qui a pour effet l'activation de plusieurs enzymes pH-dépendantes, dont l'invertase. Celle-ci est en effet soumise à une forte régulation par des variations de quelques dixièmes d'unité de pH qui commande l'utilisation métabolique du saccharose (Jacob *et al.*, 1982 ; Tupy, 1973). L'application d'éthéphon entraîne également une augmentation générale de la quantité de protéines au sein des cellules laticifères (Coupé and Chrestin 1989).



**Figure 4 : Voie de biosynthèse et régulation de l'éthylène (Wang, Li et al. 2002)**

### *b. Problèmes induits par la surexploitation*

La surexploitation de l'hévéa, due à l'intensité de saignée ou à l'emploi sans précaution de générateurs d'éthylène, conduit rapidement à une fatigue des tissus laticifères et à l'arrêt partiel ou total de la production de latex : c'est « l'encoche sèche » (Van de Syde, 1984).

Il existe différentes formes d'encoche sèche. Les unes disparaissent après une suspension assez longue des saignées, elles sont donc réversibles. Elles ne présentent pas de nécrose de l'écorce et sont le résultat d'un dysfonctionnement transitoire du tissu laticifère, ce qui peut provenir d'une fatigue induite par la surexploitation. D'autres, malgré un long repos conduisent inexorablement à la sécheresse totale de l'arbre (de Fäy et Jacob, 1989). Elles sont donc beaucoup plus graves. Elles sont caractérisées par une nécrose tissulaire qui concerne l'ensemble de l'écorce tendre (liber) et impliquent des perturbations histologiques, cytologiques et métaboliques qui rendent les manteaux laticifères non fonctionnels (Jacob *et al.*, 1994).

Ce syndrome, grave au plan économique, est devenu une priorité dans les programmes de recherche en hévéaculture. Afin d'exploiter au mieux la production de latex sans toutefois induire des dysfonctionnements chez l'arbre, l'étude des mécanismes mis en jeu dans la réponse à l'éthylène a été envisagée.

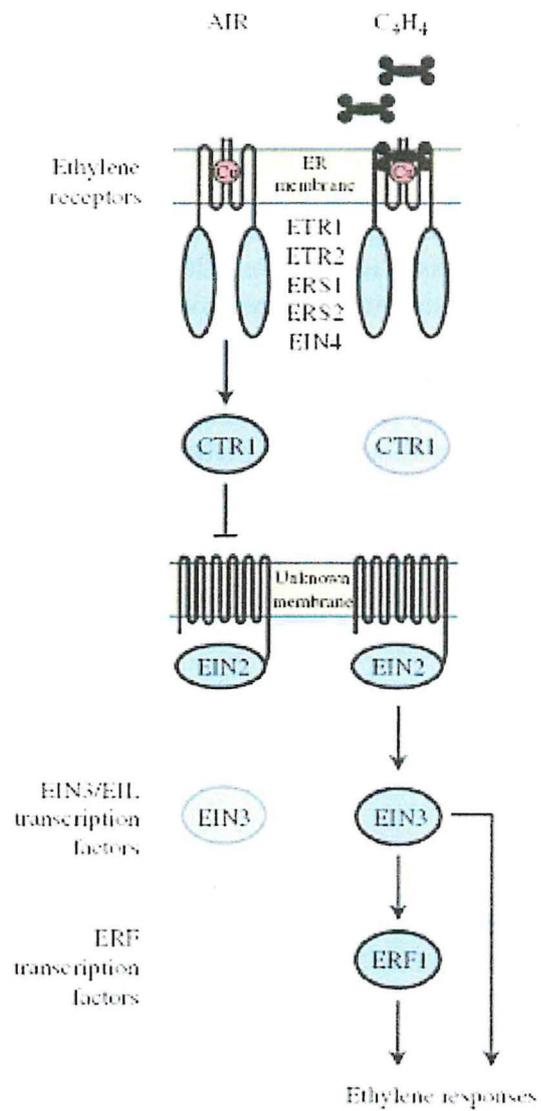
## 4) L'éthylène chez les végétaux

### *a. Biosynthèse de l'éthylène*

Chez les végétaux, la biosynthèse de l'éthylène se déroule en trois étapes (Figure 4) :

- Dans un premier temps, près de 80% de la méthionine des cellules est converti en S-AdoMet par la S-AdoMet synthetase (SAM synthetase) (Wang *et al.*, 2002). Chaque molécule de S-AdoMet synthétisée nécessite la consommation d'une molécule d'ATP (Ravel *et al.*, 1998).
- La deuxième étape consiste en la conversion de la S-AdoMet en 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) par l'ACC synthase (ACS) (Yang et Hoffmann, 1984). L'ACC peut alors être transformé en malonyl-ACC (MACC), ce qui diminue la quantité d'ACC disponible pour l'étape suivante et donc affecte la production d'éthylène. La 5-methylthioadenosine (MTA) est un produit secondaire généré lors de la production d'ACC par l'ACC synthase. Le recyclage du MTA en méthionine permet de maintenir une concentration constante de méthionine dans les cellules, même lorsque l'éthylène est rapidement synthétisé (Bleecker and Kende 2000).
- Enfin, l'ACC est oxydé par l'ACC oxydase (ACO) pour former de l'éthylène, du CO<sub>2</sub> et du cyanure. Ce dernier est détoxiqué en β-cyanoalanine par la β-cyanoalanine synthase (β-CAS).

L'étape limitante de la biosynthèse d'éthylène est la conversion de S-AdoMet en ACC par l'ACC synthase (Kende, 1993).



**Figure 5 : Schéma simplifié de la transduction du signal éthylénique (d'après (Chen, Randlett *et al.*, 2002))**

b. Perception et transduction du signal éthylène (~~Erreur ! Source du renvoi introuvable.~~) Figure 5

L'éthylène est perçu par une famille de récepteurs membranaires localisés sur le réticulum endoplasmique des cellules (Chen *et al.*, 2002).

Chez *Arabidopsis thaliana*, il existe cinq récepteurs à l'éthylène, ETR1, ETR2, ERS1, ERS2 et EIN4 (Hua and Meyerowitz 1998). Ceux-ci interagissent avec CTR1, un régulateur négatif de la signalisation de l'éthylène (Huang *et al.*, 2003).

En absence d'éthylène, les récepteurs maintiennent CTR1 dans un état actif. Celui-ci va alors réprimer la réponse en aval en inactivant le régulateur positif EIN2 (Alonso *et al.*, 1999).

Lorsqu'il y a fixation d'éthylène, l'activité des récepteurs est inhibée et par conséquent celle de CTR1 aussi. EIN2 est alors dé-réprimé et le signal transmis à des facteurs de transcription de type EIN3 et EIN3-like (EIL) (Chao *et al.*, 1997). Ces protéines sont responsables de la stimulation d'autres facteurs de transcription de type ERF qui vont réguler l'expression des gènes de réponse à l'éthylène, de manière positive ou négative (Solano *et al.*, 1998).

## 5) Objectif du stage

### a. Les études mises en place

Afin de caractériser l'expression des gènes de réponse à l'éthylène, deux banques d'hybridation soustractive et suppressive (SSH) ont été réalisées à partir d'ARN extraits d'écorces d'arbres matures non saignés (clone PB260) stimulés ou non à l'éthylène (Lefrançois, 2004). Après séquençage puis analyse bioinformatique, 158 unigènes correspondant à des gènes de réponse à l'éthylène ont été isolés. A ceux-ci ont été ajoutés des gènes de référence intervenant dans le métabolisme du latex, la biosynthèse de l'éthylène ainsi qu'au niveau du stress oxydatif et des agents coagulants. Cent-quatre-vingt-neuf unigènes ont ainsi été sélectionnés puis analysés par *Reverse Northern (MacroArray)* (Gramdi 2006), ce qui a permis d'identifier les gènes clés sous le contrôle de l'éthylène.

Cette analyse a été réalisée sur trois clones d'hévéa à métabolisme contrasté :

- Le clone PB260 présente une production de latex élevée. Il contient de faibles taux de sucre, ce qui reflète son utilisation rapide. Les faibles teneurs en thiols mesurées sont le signe d'une faible protection contre le stress oxydatif et de ce fait d'une certaine sensibilité à la surexploitation. Ainsi ce clone supporte mal la stimulation hormonale et est sensible à l'encoche sèche (Jacob *et al.*, 1995).
- A l'opposé, le clone PB 217 présente des teneurs en sucre très élevées, indication d'un métabolisme peu actif. Ceci se traduit par une faible production de latex en absence de stimulation. Son potentiel maximal de production n'est atteint qu'avec l'emploi d'une stimulation relativement intense. En revanche, il synthétise plus de thiols et n'est pas particulièrement sensibles à l'encoche sèche.
- Le clone RRIM 600 a un métabolisme intermédiaire, avec une production de latex moyenne en absence de stimulation éthylénique, mais significativement activée lors de la stimulation dans la limite du saccharose disponible.

**Tableau 2 : Mise en évidence de 5 gènes « marqueurs d'expression en réponse à l'éthylène » potentiellement discriminant les 3 clones à métabolisme contrasté par Reverse Northern (extrait du rapport de stage de Gramdi, 2006)**

Classification fonctionnelle et fonctions putatives des gènes	PB 260	RRIM 600	PB 217
<b>Transport membranaire</b>			
Aquaporin like protein	↑ ++	++ ↓ +	+ ↓
<b>Biosynthèse et regulation des hormones</b>			
ACSF2	- ↑ ++	+ ↓	→
ACO2 (H4)	↑ ++	→	+ → +
<b>Défense</b>			
Heat shock protein cognate protein 2	↑ +	→	+ ↓ -
<b>Synthèse des protéines et utilisation</b>			
Ribosomal protein YL16	↑ ++	→	↓ -

↑ = stimulation de l'expression par l'éthylène

→ = expression stable, pas de réponse à l'éthylène

↓ = inhibition de l'expression par l'éthylène

**Tableau 3 : Propriétés des membres des différentes sous-familles d'aquaporine chez les végétaux supérieurs (Kaldenhoff and Fischer 2006)**

Plant aquaporin subfamily	Localization		Physiological functions	Regulation
	Tissue	Subcellular		
TIP	Seed, leaf, root	Vacuolar membranes (tonoplast)	Transport of water, urea, NH <sub>3</sub> /NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Phosphorylation
NIP	Root nodules	Peribacteroid membrane	Transport of water, glycerol Transport of glycerol	Phosphorylation, protein-protein interaction
SIP	-	Endoplasmic reticulum membrane	-	-
PIP	Roots, shoot, leaves, florescence	Plasma membrane	Transport of CO <sub>2</sub> , glycerol, water	Heteromerization of PIP1 and PIP2 monomers, Ca <sup>2+</sup> , pH, molecular trafficking, phosphorylation

Trente-cinq gènes « marqueurs d'expression en réponse au stress éthylénique » potentiels ont été mis en évidence par *Reverse Northern*. Sur l'ensemble de ces gènes, 5 présentent des profils d'expression qui pourraient permettre de discriminer les 3 clones utilisés (Tableau 2).

#### *b. Déroulement du stage*

Ce stage a pour objectif d'étudier l'expression de deux catégories de gènes par RT-PCR quantitative en réponse à l'éthylène. Cette analyse se fera sur les 3 clones d'hévéa à métabolisme contrasté à partir de feuilles et d'écorces de plants blessés ou traités à l'éthylène dans un caisson hermétique.

#### → Gènes choisis pour leur expression différentielle observée par *Reverse Northern*

Il s'agit dans une première partie de valider les résultats obtenus par *Reverse Northern* en étudiant l'expression des gènes d'intérêts par RT-PCR quantitative sur plusieurs répétitions biologiques. Cette étude se fera sur trois gènes :

##### - **Un gène codant une Aquaporin-like protein (*HbPIPLike*):**

Les aquaporines sont une classe de protéines situées dans les membranes biologiques des cellules eucaryotes et procaryotes. Elles forment des pores perméables aux petites molécules telles que l'eau et le glycérol ainsi qu'aux composés volatils comme le CO<sub>2</sub> ou le NH<sub>3</sub> (Biela *et al.*, 1999; Nakhoul *et al.*, 2001; Uehlein *et al.*, 2003). Chez *Arabidopsis thaliana*, 35 gènes codant pour des aquaporines ont été identifiés (Johanson *et al.*, 2001).

Chez les végétaux supérieurs, les aquaporines sont divisées en 4 sous-familles : les *tonoplast intrinsic proteins* (TIPs), *nodulin 26-like intrinsic proteins* (NIPs), *small basic intrinsic proteins* (SIPs) ainsi que les *plasma membrane intrinsic proteins* (PIPs). Ces quatre sous-familles diffèrent entre elles par leur localisation, leur fonction ou encore leur mécanisme de régulation (Kaldenhoff and Fischer 2006) (Tableau 3).

Le gène utilisé dans cette analyse code pour une aquaporine de type PIP. Les PIP représentent la sous-famille d'aquaporines possédant le plus grand nombre de membres (13 membres chez *Arabidopsis thaliana*).

##### - **Un gène codant une 70kDa Heat Shock Cognate Protein 2 (*HbHSCP 70*):**

Les *Heat Shock Protein* (HSP) sont des protéines chaperonnes. Elles assurent le repliement tridimensionnel des protéines nouvellement synthétisées et permettent également aux protéines dénaturées sous l'effet d'un stress de retrouver leur conformation originale (Lee *et al.*, 1995; Glover and Lindquist 1998). Leur expression est stimulée en réponse à des augmentations rapides de température, sous la régulation de facteurs de transcription appelés *Heat Shock Factors* (HSFs). La structure des protéines est en effet sensible à la chaleur, elles se dénaturent et perdent leur activité biologique. Les HSP préviennent ainsi les dommages potentiellement causés par un mauvais repliement tridimensionnel.

Chez les eucaryotes, les HSP70 sont codées par une famille multigénique hautement conservée. Ainsi, chez *Arabidopsis thaliana*, au moins 14 gènes codent pour ces protéines (Sung *et al.*, 2001).

Les Heat Shock Cognate Protein 70 désignent les membres de la famille des gènes *HSP70* qui sont exprimées en conditions normales aussi bien qu'en condition de stress.

- **Le gène *HbACS-F2* :**

Ce gène code une acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique synthase appartenant à une famille multigénique (Ge *et al.*, 2000 ; Kende, 1993) et catalyse l'étape limitante de la biosynthèse d'éthylène (Yang et Hoffmann, 1984). Son expression est régulée de façon différentielle par différents signaux développementaux, environnementaux et hormonaux (Barry *et al.*, 2000; Llop-Tous *et al.*, 2000). La séquence complète du génome d'*Arabidopsis* a permis d'identifier 12 gènes *ACS* potentiels. Chez l'hévéa, ils seraient au nombre de 5 (Kuswanhadi, 2006).

→ **Gènes codant des facteurs de transcription**

Dans un deuxième temps, nous étudierons l'expression de quatre gènes codant des facteurs de transcription. Ces gènes ont été mis en évidence dans les banques SSH comme étant des gènes de réponse à l'éthylène. Cependant la technique de *Macro-Array* ne permet pas d'observer une variation significative de leur expression, ce qui peut s'expliquer par les bruits de fonds importants obtenus lors de l'utilisation de cette technique (Gramdi, 2006), ou encore par le grand nombre d'étapes qui conduisent à sa réalisation. Ces facteurs de transcription pouvant jouer un rôle important dans la réponse à l'éthylène, une analyse plus fine de leur expression sera réalisée par Q-PCR. Les gènes étudiés dans cette partie sont :

- **Un gène codant une Cys-3-His zinc finger protein (*HbZFP*) :**

Les protéines à doigt de zinc tirent leur nom de leur structure, dans laquelle un groupe d'acides aminés conservés sont liés par un ion zinc. Plusieurs motifs ZnF ont été définis, différents selon leur structure, leur affinité ou encore leur mode de fixation. Dans la protéine étudiée ici, le zinc est maintenu en place par des résidus Cys(3)His. Ces protéines sont capables de se fixer à l'ARN (Carballo *et al.*, 1998).

- **Un gène codant un facteur de transcription identifié chez *Vicia faba* (*HbTF vicia faba*)**

La séquence de l'EST isolé est trop courte ce qui ne permet pas d'avoir plus d'information sur la fonction putative de ce gène de fève.

- **Le gène *HbBTF3b-like* qui code un facteur de transcription de type Basic Transcription Factor 3 :**

Il s'agit d'une protéine requise pour l'initiation de la transcription par l'ARN polymérase II, responsable de la synthèse des ARN messagers (Zheng *et al.*, 1987). Ce facteur est exprimé sous deux iso-formes nommées a et b. BTF3 ne se fixe pas directement au niveau du promoteur mais est capable de former un complexe stable avec l'ARN polymérase II (Zheng *et al.*, 1990).

- **Un gène codant une auxin-repressed protein (*HbARP*) :**

L'auxine, hormone végétale, régule différents processus de croissance et développement, dont la formation des racines latérales, la dominance apicale, le tropisme ainsi que la différenciation des tissus vasculaires (Muday 2001). Un certain nombre de gènes ont été classés en tant que gènes de réponse à l'auxine, leur niveau d'expression augmentant dans les minutes après l'application d'auxine, indépendamment de la synthèse de protéines *de novo* (Guilfoyle *et al.*, 1998). Cependant, les gènes codant pour des protéines dont l'expression est réprimée par l'auxine (ARP pour *auxin-repressed protein*) sont relativement peu étudiés. Trois orthologues de ARP ont été isolés et décrits, dont RpARP chez *Robinia pseudoacacia*, qui est une variété de caroubier (Park and Han 2003).



**Figure 6 : Jeune plant d'hévéa greffé ayant atteint une unité de croissance**



a



b

**Figure 7 : Traitements de blessure réalisés sur des feuilles (a) et des écorces (b) d'hévéa.**



**Figure 8 : Plant d'hévéa en caisson traité à l'éthylène**

### III- MATERIEL ET METHODES

#### 1) Matériel végétal

Les différents génotypes d'*Hevea brasiliensis* ont été propagés par greffage. Les expériences ont été réalisées sur des plants greffés en serre jusqu'au développement complet de leur première unité de croissance (Figure 6). Trois clones sont ici étudiés : PB217, PB260 et RRIM600. Chacun d'eux a été soumis à différents traitements.

#### 2) Traitements et applications des stress abiotiques

Les traitements ont été effectués sur les trois clones selon une cinétique établie. Pour chaque point de cette cinétique, trois répétitions biologiques par clone sont réalisées. Pour chaque répétition biologique sont prélevées indépendamment les feuilles et les écorces.

##### *a. La blessure*

Les plants ayant subi ce traitement ont été blessés au niveau des feuilles (pressions sur toute la surface des feuilles à l'aide d'une pince crantée) et des écorces (entailles au scalpel espacées de 1 centimètre chacune) (Figure 7). Les prélèvements ont été effectués 15 minutes et 4 heures après la blessure. Pour ces deux points de cinétiques, les témoins associés correspondent à des plants n'ayant subi aucune blessure, les prélèvements ayant été réalisés au même moment de la journée que pour les plants traités.

##### *b. Ethylène*

Le traitement à l'éthylène se fait dans des caissons hermétiques de 300 litres (Figure 8). La mise en caisson des plants se fait la veille du traitement (le caisson reste ouvert jusqu'au lendemain), afin de limiter les effets du stress généré lors de leur transport. Le lendemain matin, le caisson est fermé et le gaz y est injecté à l'aide d'une seringue afin d'obtenir une concentration en éthylène égale à 1ppm ( $1\mu\text{L.L}^{-1}$ ). Les prélèvements ont été effectués 4 heures et 24 heures après l'injection. La mise en caisson pouvant avoir un impact sur l'expression des gènes étudiés, les témoins associés à ces échantillons ont été placés dans les mêmes conditions que les plants traités, la seule différence reposant sur l'absence de traitement.

Le matériel végétal prélevé est immédiatement refroidi dans l'azote liquide puis conservé à  $-80^{\circ}\text{C}$  jusqu'à utilisation.

#### 3) Extraction des ARN totaux et synthèse des ADN complémentaires

Les extractions d'ARN sont réalisées par ultracentrifugation sur coussin de chlorure de césium (CsCl). Pour cela, 1g de matériel végétal est broyé dans l'azote liquide. La poudre ainsi obtenue est transférée dans un tube Falcon de 50mL contenant 9,5mL de tampon d'extraction (Annexe 1). Après homogénéisation au vortex (30 secondes), ce qui permet

**Tableau 4 : Composition du mélange réactionnel utilisé pour une PCR actine sur ARN**

Solution stock		Volume pour une réaction (µL)
Produits	Concentrations	
Tampon	10 x	2,5
MgCl <sub>2</sub>	2 mM	0,25
d-NTP	10mM	1
ARN		20 à 50 ng
Amorces F+R	5µM chacune	2
Taq polymérase	1u/µL	0.25
H <sub>2</sub> O		Qsp 25

**Tableau 5 : Conditions utilisées pour une PCR actine sur ARN**

Etape	Température (°C)	Temps (min)	Nombre de cycles
Dénaturation	94°C	3'00	1x
	94°C	0'30	40x
Hybridation	58°C	1'00	
Polymérisation	72°C	1'00	
Fin extension	72°C	7'00	1x
Stockage	15°C		

**Tableau 6 : Liste des amorces spécifiques définies à partir des séquences partielles des gènes étudiés chez *H. brasiliensis*.**

Nom	Séquence	Nb bases
HbPIPlike-F13	GACTGTGATTGGTTACAAGAGC	22
HbPIPlike-R204	GACACTTTCCTCGCCAAAA	19
HbARP-F140	TAAGGGTCTTGGTGCTCA	18
HbARP-R335	CTCGTATCACACCAACCAT	19
HbBTF3b-F70	ACCCACCTGTCCTCTGTAA	19
HbBTF3b-R266	TCTTCTCATGCTGCCCTT	18
HbTFviciafaba-F31	GGTGATGAGAAGCCATT	18
HbTFviciafaba-R210	ATCCACCTTCTTTTCCTC	18
HbZFP-F30	TCCCAGCCAGCTAATTCCTTCC	22
HbZFP-R212	CCTCCTCTCTTTGCTTGAA	19
Hb70HSCP2-F13	GGCAGGTACAAGGTGCTGGTCCT	23
Hb70HSCP2-R198	ACCCAACTACAACAGAATGTGGAT	25
HbACSF2-F81	CATTGGGCTGCCAGGCTTCA	20
HbACSF2-R260	AGCCTTCTTGAGCTTTCCGC	20

d'optimiser la lyse des membranes, le mélange est placé dans la glace pendant 15min. Les échantillons sont ensuite centrifugés 30 minutes à 4°C (10000g) afin de précipiter les débris cellulaires. Le surnageant est alors récupéré et déposé sur 3mL de CsCl. Après une ultracentrifugation de 20 heures à 20°C (32000 rpm) (rotor Beckman SW41), on observe deux phases distinctes : le surnageant et le coussin de CsCl, que seuls les ARN peuvent traverser de par leur densité. La phase liquide est éliminée délicatement, il reste alors un culot d'ARN transparent qui est lavé à l'éthanol 70% puis laissé séché pendant une heure avant d'être repris dans 200µL d'eau stérile.

Les ARN totaux extraits sont ensuite dosés par spectrophotométrie à 260nm (pic d'absorption des acides nucléiques). Le ratio  $DO_{260}/DO_{280}$  permet de voir une éventuelle contamination des ARN par les protéines (qui absorbent à 280nm), et donc d'estimer la pureté de l'extrait. Ce ratio doit être compris entre 1,8 et 2,0. La qualité des ARN est visualisée par électrophorèse d'une part directement (dégradation de l'ARN) et d'autre part après amplification par PCR avec les amorces du gène de l'actine (cas de contamination par de l'ADN génomique). Pour chaque réaction est réalisé un mélange réactionnel précis (Tableau 4). La PCR est alors lancée selon des conditions prédéfinies (Tableau 5).

#### 4) Synthèse des ADN complémentaires simples brins (ADNc)

La synthèse des ADNc est ensuite réalisée sur 2µg d'ARN totaux avec le Kit Revertaid™ M-MuLV Reverse Transcriptase de Fermentas.

Pour cela, 2µg d'extrait d'ARN totaux sont mélangés à 1µL d'oligo(dT)18 VN à 10µM (V=C,G ou A) et de l'eau stérile (qsp 11µL) puis mis à incuber 5 minutes à 70°C pour dénaturer les ARN. Les tubes sont ensuite refroidis sur glace pendant 3 minutes. A chaque tube est ajouté le mélange réactionnel suivant :

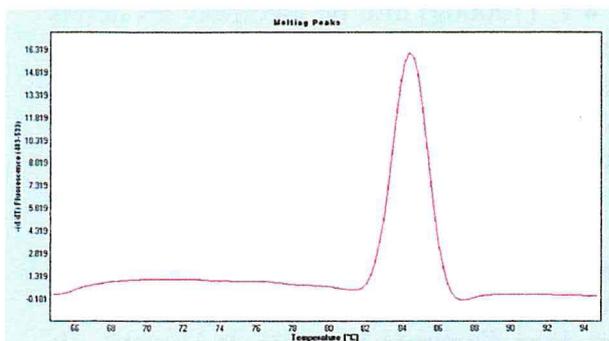
Solution stock	Volume par réaction (µL)
Tampon de réaction 5x	4
dNTP à 10 mM chaque	2
Ribonuclease Inhibitor (40 u/µL)	0,5 (soit 20 unités)
H <sub>2</sub> O MQ stérile	1,5

Les réactions sont placées 5 minutes à 37°C puis 1µL de Reverse Transcriptase (RevertAid™ M-MuLV, 200 u/µL) est ajouté à chaque tube. Les tubes sont alors mis à incuber 60 minutes à 42°C au bain marie. La réaction de synthèse des ADNc est ensuite stoppée à 70°C pendant 10 minutes. Les ADNc ainsi obtenus sont conservés à -20°C jusqu'à leur utilisation. La synthèse des ADNc est ensuite vérifiée par une amplification PCR des ADNc avec les amorces du gène de l'actine.

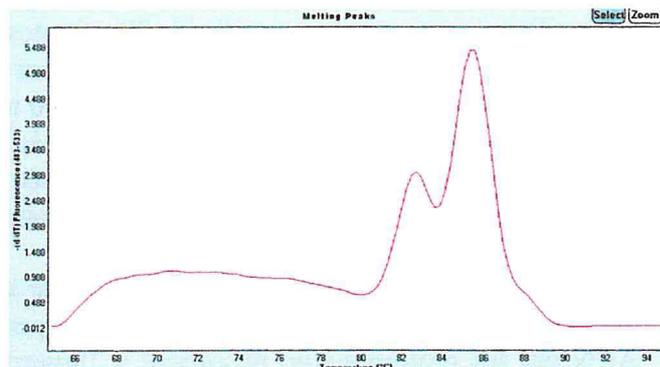
#### 5) Définition des séquences des amorces

Pour chaque gène étudié, les amorces (Tableau 6) sont dessinées grâce au module *Primer Design* du logiciel Vector NTI (Invitrogen). Certains paramètres sont fixés pour la définition des amorces :

- la longueur de la séquence à amplifier (entre 180pb et 200pb),
- le nombre de bases des amorces (entre 18 et 25),
- la température d'hybridation ( $T_m$ , comprise entre 58°C et 62°C)



a : amplification spécifique



b : amplification non spécifique

**Figure 9 : Courbe de fusion obtenue après amplification par Q-PCR**

**Tableau 7 : Composition du mélange réactionnel utilisé pour la réamplification par PCR**

Solution stock	Volume (µL)
Matrice : ADNc	1
Tampon 10x	5
MgCl <sub>2</sub> 50mM	0.5
d-NTP 2mM	2
amorces F+ R 5 µM	4
Taq polymérase (1u/µL)	0.5
H <sub>2</sub> O	37
µL/puits	49

**Tableau 8 : Conditions utilisées pour la réamplification par PCR**

Etape	Température (°C)	Temps (min)	Nombre de cycles
Dénaturation	94°C	1'30	1x
	94°C	0'30	40x
Hybridation	58°C	1'00	
Polymérisation	72°C	0'45	
Fin extension	72°C	7'00	1x
Stockage	15°C		

- et le pourcentage de GC (entre 45% et 55%).

## 6) Vérification de la fonctionnalité et de la spécificité des amorces

La spécificité des amorces est vérifiée par PCR quantitative à partir d'un mélange d'ADNc dilués au 1/25 provenant de feuilles ou d'écorces ayant subits différents traitements.

Pour chaque réaction, le mélange réactionnel suivant est réalisé:

Solution stock	Volume (µL)
Matrice : ADNc dilué au 1/25 <sup>ème</sup>	3
amorces F+R à 5 µM	1,5
H <sub>2</sub> O	3
Syber Green 2X	7,5

Les mélanges réactionnels sont chargés dans des plaques 96 puits. Ces plaques sont centrifugées 30 secondes à 1500 tr/min avant d'être insérée dans le Light Cycler préalablement programmé. La première vérification consiste à observer une amplification, et la seconde à s'assurer de la spécificité des amorces à partir des courbes de fusion (Figure 9). L'observation d'un pic unique signifie que l'amplification est spécifique. Inversement, si plusieurs pics sont visibles, cela signifie que des produits non-spécifiques ont été amplifiés.

## 7) Clonage et vérification des produits PCR

### a. Réamplification par PCR

Les produits spécifiques issus de la PCR quantitative sont ensuite dilués au 1/10 avant d'être réamplifiés par une PCR normale afin de générer des extrémités cohésives aux amplicons. En effet, la Taq polymérase ajoute un A à la fin du fragment généré. Les produits PCR seront ensuite clonés dans un vecteur ouvert avec un T sortant.

Pour chaque réaction de PCR est réalisé un mélange réactionnel précis (Tableau 7). Dans chaque puits sont distribués 49µL de mix ainsi que 1µL de produit de PCR quantitative dilué. La PCR est ensuite réalisée selon des conditions prédéfinies (Tableau 8)

Les produits PCR sont vérifiés par électrophorèse sur gel d'agarose 1,5%. Une seule bande doit être visible autour de 180-200pb.

### b. Ligation

Les produits PCR sont ensuite clonés dans le vecteur pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup> (Kit Invitrogen) (Annexe 2). Pour cela, le mélange suivant est réalisé dans un tube:

Solution	µL/tube
produit PCR	0.5 à 4
sel	1
H <sub>2</sub> O	QSP 5
vecteur PCR2.1	1
volume final	6

**Tableau 9 : Composition du mélange réactionnel utilisé pour la PCR sur colonies**

Solution stock	Volume ( $\mu\text{L}$ )
Tampon 10x	2.5
MgCl <sub>2</sub>	0,25
d-NTP	1
Amorces F+R à 5 $\mu\text{M}$	2
Taq polymérase	0.25
Eau (Merck)	19
Volume total	25

**Tableau 10 : Conditions utilisées pour la PCR sur colonies**

Etape	Température (°C)	Temps (min)	Nombre de cycles
Dénaturation	94°C	5'00	1x
	94°C	0'30	40x
Hybridation	50°C	1'00	
Polymérisation	72°C	3'00	
Fin extension	72°C	7'00	1x
Stockage	15°C		

Le volume de produit PCR utilisé dépend de l'intensité de la bande observée sur le gel d'électrophorèse. Ainsi, plus la bande observée est de faible intensité, plus le volume de produit PCR utilisé pour la réaction sera grand. Le mélange précédent est laissé 5 minutes à température ambiante.

#### *c. Transformation*

Les produits de ligation sont incorporés par transformation dans des bactéries chimio-compétentes fournies avec le kit de clonage (*Escherichia coli* One Shot TOP10): 5µL de la solution sont ajoutés à 25µL de bactéries. Le tube est laissé sur glace 30 minutes, puis mis à incuber 1'30 à 37°C. Ce choc thermique va induire l'ouverture des pores de la bactérie et permettre ainsi la pénétration de l'ADN. Les bactéries sont alors immédiatement redéposées sur glace pendant 2 minutes, ce qui permet de refermer leurs pores et ainsi d'empêcher l'ADN de ressortir. Quarante-cinq µL de milieu SOC (Annexe 3) sont alors rajoutés dans le tube qui est mis sous agitation à 37°C pendant une heure. La culture ainsi obtenue est étalée sur du milieu LB agar, contenant de l'ampiciline, de l'IPTG et du X-gal (Annexe 3).

L'IPTG est un analogue du lactose. Il permet d'induire l'expression du gène *lac Z* contenu dans la séquence du vecteur (Annexe 2). Ce gène code pour une enzyme : la β-galactosidase, capable d'hydrolyser le X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolylo-β-galactoside) en un composé bleu, ce qui va permettre de discriminer les bactéries ayant intégré l'insert. En effet, le site d'insertion du produit PCR se trouve dans la séquence codante du gène *lac Z*. Ainsi, lorsque l'insertion a lieu, ce gène est interrompu et la β-galactosidase ne peut pas être synthétisée. Le X-Gal présent dans le milieu n'est pas hydrolysé : les colonies ayant intégré l'insert sont donc blanches.

#### *d. Vérification PCR*

La présence de l'insert dans les bactéries est vérifiée par PCR sur colonies. Pour chaque réaction est réalisé un mélange réactionnel précis (Tableau 9).

Pour chaque réaction de PCR, une colonie blanche est sélectionnée, puis repiquée à l'aide d'un cône de pipette sur une boîte de Pétri, contenant du milieu LB complété avec de l'Ampicilline à 100mg/l (LB+Amp), quadrillée et numérotée de 1 à 96. Puis le cône est plongé dans le puits correspondant de la plaque PCR contenant le mélange réactionnel ci-dessus. Pour chaque ligation réalisée, environ 20 colonies sont ainsi repiquées puis amplifiées. La PCR est réalisée selon des conditions prédéfinies (Tableau 10). La culture bactérienne est mise à incuber une nuit à 37°C.

#### *e. Purification du plasmide*

Les bactéries ayant bien intégré l'insert sont ensuite prélevées puis mises en culture en milieu liquide LB+Amp une nuit à 37°C. Le lendemain matin, les plasmides correspondant sont purifiés en utilisant le kit Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) (Annexe 3).

#### *f. Restriction*

La présence de l'insert peut être aussi vérifiée par restriction du plasmide purifié par l'enzyme *EcoRI* afin de générer deux fragments distincts dont l'insert. Pour cela, 5µL du plasmide purifié sont mélangés avec 1,5µL de Tampon NEB4 (New England Biolabs), 0,5µL

<i>Program Name</i>	<i>Cycles</i>	<i>Analysis Mode</i>
Dénaturation	1	None
Amplification	45	Quantification
Courbe de fusion	1	Melting curves
Refroidissement	1	None

Saisir les températures

► Dénaturation	<i>Target (°c)</i>	<i>Aquisition mode</i>	<i>Hold (hh :mm :ss)</i>	<i>Ramp Rate</i>	<i>Aquisitions (per °c)</i>
	95	none	00 :05 :00	4.4 programmé	

► Amplification	<i>Target (°c)</i>	<i>Aquisition mode</i>	<i>Hold (hh :mm :ss)</i>	<i>Ramp Rate</i>	<i>Aquisitions (per °c)</i>
	95	None	00 :00 :20	4.4	
	60	none	00 :00 :15	2.2	
	72	single	00 :00 :20	4.4	

► Courbe de fusion	<i>Target (°c)</i>	<i>Aquisition mode</i>	<i>Hold (hh :mm :ss)</i>	<i>Ramp Rate</i>	<i>Aquisitions (per °c)</i>
	95	None	00 :00 :05	4.4	
	65	none	00 :01 :00	2.2	
	95	continuous			5

► Refroidissement	<i>Target (°c)</i>	<i>Aquisition mode</i>	<i>Hold (hh :mm :ss)</i>	<i>Ramp Rate</i>	<i>Aquisitions (per °c)</i>
	40	none	00 :00 :30	2.2	

**Figure 10 : Programme utilisé pour la Q-PCR sur le logiciel Lightcycler® 480 Software release 1.5.0**

d'enzyme *EcoRI* (à 20000 U/mL) ainsi que 8µL d'H<sub>2</sub>O. Le mélange ainsi obtenu est placé à 37°C pendant une heure, puis déposé sur gel d'agarose 1,5%.

#### *g. Séquençage*

Les extraits plasmidiques sont envoyés à séquencer chez GATC Biotech (Allemagne), puis la séquence est vérifiée par alignement avec la séquence du gène étudié grâce au logiciel Vector NTI (Invitrogen).

### **8) Analyse d'expression génique par PCR quantitative (Q-PCR)**

#### *a. Préparation des mélanges réactionnels en plaque 96 puits*

L'appareil utilisé pour la réalisation des PCR quantitatives est le LightCycler 480 (Roche).

Les réactions se font dans des plaques de 96 puits. Pour chaque réaction, le mix suivant est réalisé :

<b>Solution stock</b>	<b>Volume (µL)</b>
Amorces F+R à 5 µM	1,5
H <sub>2</sub> O	3
Syber Green 2x	7,5
Volume total / réaction	12µL/puits

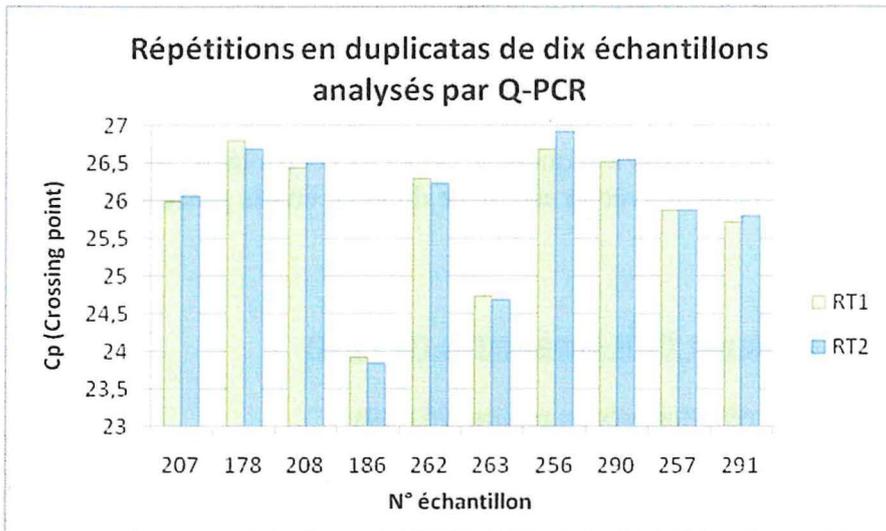
Dans chaque puits est distribué 12µL de mix ainsi que 3µL d'ADNc dilué au 1/25. La plaque est centrifugée 30 secondes à 1500 tr/min avant d'être insérée dans le Light Cycler préalablement programmé. L'observation des résultats se fait sur le logiciel Lightcycler® 480 Software release 1.5.0.

La quantification se fait de manière relative, c'est-à-dire qu'on étudie un gène cible par rapport à un gène constitutif qui servira de référence. Il s'agit en l'occurrence du gène de l'actine. Chaque échantillon doit donc être amplifié avec les amorces du gène cible et en parallèle avec les amorces du gène de l'actine. Par ailleurs, les échantillons sont déposés sur la plaque en duplicata.

Il est également nécessaire de réaliser une courbe standard pour chaque gène (gènes cibles et gène de référence) afin de déterminer l'efficacité de la PCR. Pour cela une gamme de dilutions est réalisée à partir d'un mélange d'ADNc issus de plants ayant subi divers traitements.

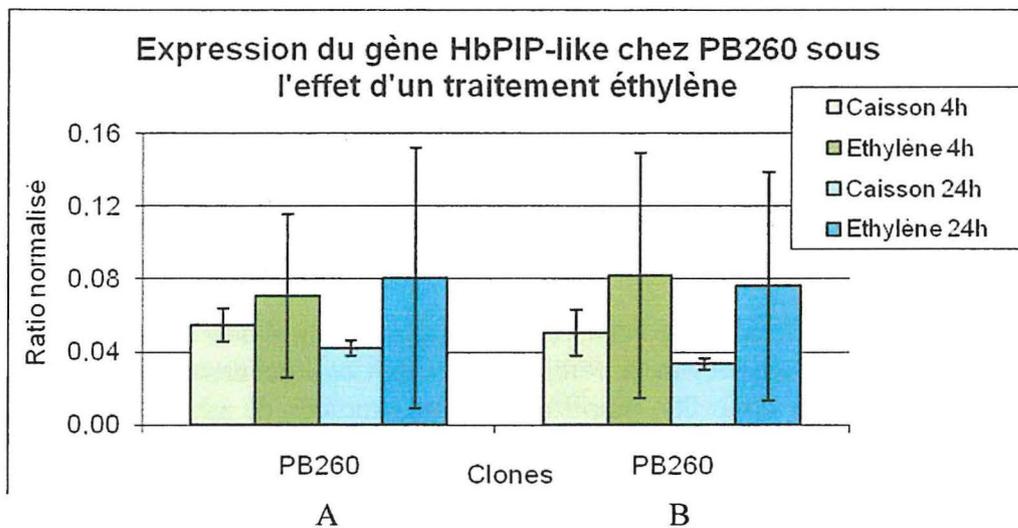
Enfin, les différents plasmides contenant les amplicons validés sont dilués par un facteur 10<sup>-4</sup> à 10<sup>-7</sup> puis analysés par Q-PCR afin de définir des calibrateurs. Ces calibrateurs permettent de s'assurer que la PCR est fonctionnelle, de normaliser les réactions pour un gène donné et ainsi de comparer des niveaux d'expression entre traitement positionnés sur plusieurs plaques.

Les conditions de PCR utilisées sont à programmer puis à enregistrer sur l'ordinateur pour ensuite y faire appel à chaque analyse (Figure 10).



**Figure 11 :** Analyse graphique de la variabilité entre répétitions techniques de la Q-PCR

RT = Répétition technique



**Figure 12 : Répétabilité des résultats de Q-PCR**

A : Echantillons dispersés sur des plaques différentes

B : Echantillons groupés sur une même plaque

## IV- RESULTATS

### 1) Analyse des différentes sources de variabilité des résultats de Q-PCR

Dans cette analyse, différents tests statistiques ont été réalisés à l'aide du logiciel Statistix. Les variables étudiées (ratio normalisé et Crossing points (Cp, Annexe 5), sont supposées suivre une loi normale. Les tests réalisés sont donc paramétriques.

#### a. *Analyse de la variabilité au sein des répétitions techniques*

La variabilité technique est mesurée entre les différents réplicas d'un même échantillon déposés sur une même plaque de Q-PCR. Dans cette expérience, la variation observée entre répétitions techniques est comprise entre 0% (échantillon n°257) et 6% (n°256) (figure 11). Un test de Student ( $\alpha=5\%$ ), qui permet la comparaison entre deux échantillons, vient confirmer qu'il n'y a pas de différence significative entre les répliquas réalisés. A l'origine, chaque échantillon devait être analysé en triplicatas, mais la faible variabilité observée a permis de réaliser les analyses en duplicatas.

#### b. *Analyse de la variabilité entre plaques (2 analyses indépendantes)*

Afin d'étudier l'éventuelle variabilité imputable aux différentes plaques de Q-PCR, 12 échantillons ont été analysés sur deux expériences indépendantes (4 traitements, avec pour chaque traitement, trois répétitions biologiques). Dans une première analyse, ces échantillons ont été répartis sur différentes plaques. Dans un deuxième temps ils ont été regroupés sur une même plaque. L'analyse graphique des résultats obtenus (~~Erreur! Source du renvoi introuvable.~~), complétée par un test de Student à 5% indique qu'il n'y a pas de différence significative entre les deux expériences. La variabilité des résultats de Q-PCR n'est donc pas influencée significativement par l'effet plaque. Figure 11

#### c. *Stabilité du gène de ménage*

La quantification par Q-PCR se fait ici de manière relative, c'est-à-dire que l'expression du gène étudié est normalisée par rapport à celle d'un gène de référence. Bien souvent il s'agit de gènes dit « de ménage », c'est-à-dire dont l'expression est constitutive. Elle doit ainsi ne pas varier entre les différentes conditions comparées. En effet, le cas contraire, cela empêcherait de conclure quant à l'origine des variations observées. Il a été démontré que l'expression de certains gènes de ménage, tels que *GAPDH* et  *$\beta$ -actin*, peut être affectée par différents traitements, processus biologiques et même différents tissus ou types cellulaires (Bustin, 2000). Ceci provient probablement de la sensibilité accrue de la technique de PCR en temps réel par rapport aux techniques de quantification traditionnelles. De fait, quand on utilise un gène de ménage il est impératif de valider sa stabilité sur les échantillons à étudier.

Afin de vérifier la stabilité de l'actine, gène de référence choisi dans cette étude, une analyse de variance (ANOVA) à un facteur a été réalisée sur les valeurs des Cp de l'actine. Elle a permis de mettre en évidence qu'il n'y avait aucune influence significative du traitement réalisé sur cette variable.

**Tableau1: Analyse statistique de l'impact du clone, du traitement et des répétitions biologiques sur l'expression des différents gènes**

ANOVA réalisée à un seuil de significativité  $\alpha = 5\%$

	<i>HbPIP-like</i>	<i>HbHSCP70</i>	<i>HbARP</i>	<i>HbBTF3b-like</i>
Clone	*	(ns)	**	**
Traitement	***	***	ns	**
Répétition	ns	ns	ns	ns

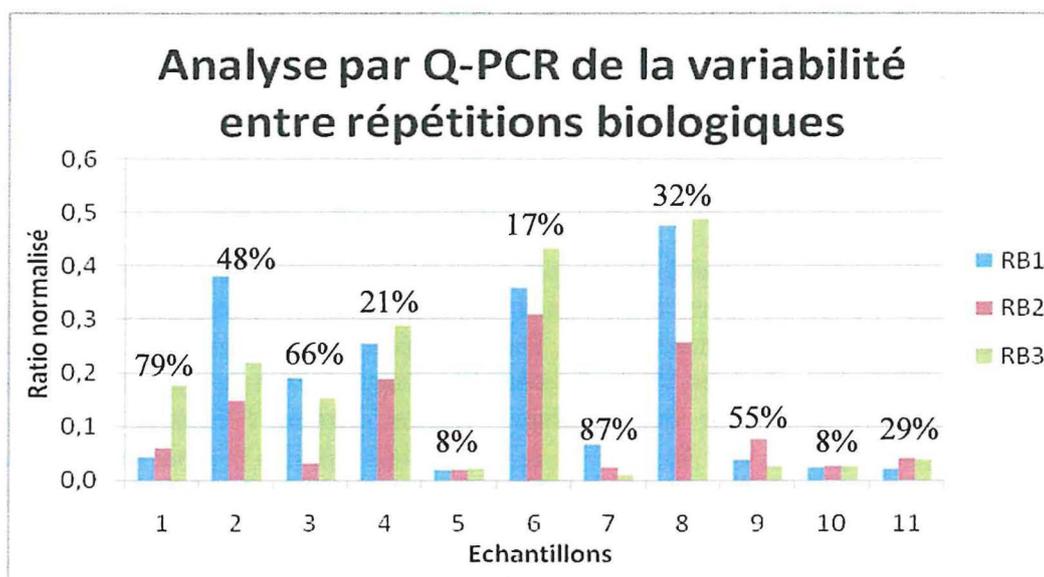
ns = non significatif,  $0,1 < p \text{ value}$

(ns) = non significatif,  $0,05 < p \text{ value} < 0,1$

\* =  $0,01 < p \text{ value} < 0,05$

\*\* =  $0,001 < p \text{ value} < 0,01$

\*\*\* =  $p \text{ value} < 0,001$



**Figure 13 : Analyse de la variabilité entre répétitions biologiques obtenue par Q-PCR**  
RB = Répétition biologique

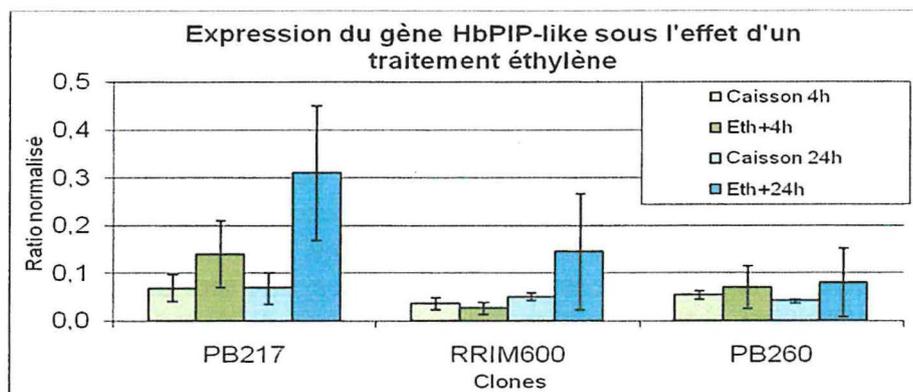
#### *d. Analyse de la variabilité au sein des répétitions biologiques*

Chaque point de cinétique étudié représente trois répétitions biologiques, c'est-à-dire trois jeunes plants sur lesquels ont été prélevés indépendamment les feuilles et l'écorce. Afin de déterminer l'impact de la variabilité entre répétitions biologiques sur les résultats, une première analyse a été réalisée sur 11 échantillons. Il a été choisi uniquement des échantillons n'ayant subi aucun traitement, afin que celui-ci n'affecte pas la variabilité observée. Ainsi, si une éventuelle différence significative est mise en évidence, elle sera uniquement imputable aux différences qu'il existe entre les plants. Dans cette série de données, la variation entre répétitions biologiques est comprise entre 8% et 87% (Figure 13). Une ANOVA réalisée sur ces valeurs permet d'affirmer que ce facteur n'influence pas les résultats de manière significative.

Une seconde ANOVA (Tableau 11) a ensuite été réalisée sur l'ensemble des données. Ici non plus, aucune différence significative n'est mise en évidence. Parallèlement, la variabilité biologique sera étudiée tout au long de cette analyse pour chaque série de données et viendra appuyer les résultats obtenus grâce à la mesure du coefficient de variation.

#### *e. Impact du génotype et du traitement sur l'expression des différents gènes*

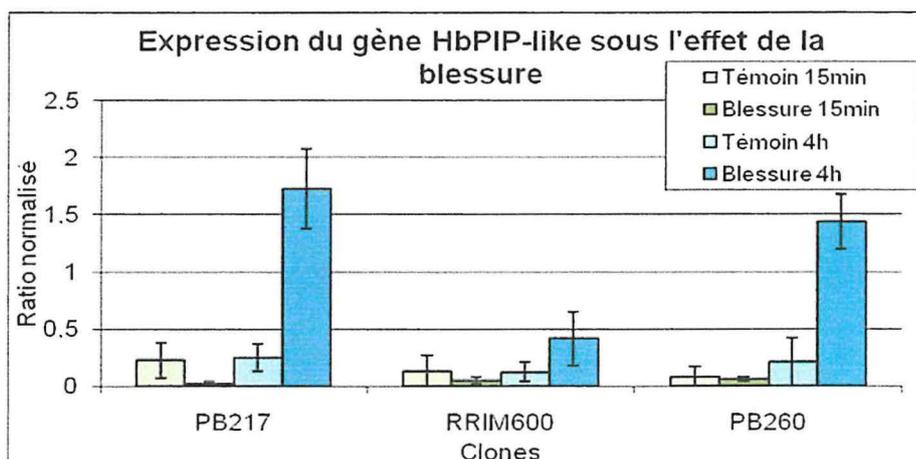
L'ANOVA réalisée précédemment met également en évidence l'effet du traitement ainsi que du clone étudié sur l'expression des différents gènes. Comme attendu, ces deux facteurs influencent de manière significative les résultats. L'expression des gènes étudiés varie donc selon le clone et selon le traitement réalisé. Les résultats vont par la suite être analysés de manière plus précise afin d'identifier l'effet de chaque traitement en fonction des clones. Il existe pour cela des tests statistiques à faire en aval de l'ANOVA, tel que le test de Fischer LSD (Least Significant Difference) ( $\alpha=5\%$ ) qui permet de comparer les moyennes deux à deux.



Gène étudié	Clone	Traitement			
		Témoin caisson 4h	Ethylène 4h	Témoin caisson 24h	Ethylène 24h
<i>HbPIP-like</i>	PB217	0,07±0,03 <sup>bcd</sup>	0,14±0,07 <sup>bcd</sup>	0,07±0,03 <sup>bcd</sup>	0,31±0,14 <sup>a</sup>
	PB260	0,06±0,01 <sup>bcd</sup>	0,07±0,05 <sup>bcd</sup>	0,04±0,004 <sup>bcd</sup>	0,08±0,07 <sup>bcd</sup>
	RRIM600	0,04±0,01 <sup>bcd</sup>	0,03±0,01 <sup>d</sup>	0,05±0,01 <sup>bcd</sup>	0,15±0,12 <sup>b</sup>

Test de Fischer LSD. Toutes les valeurs ayant la même lettre ne sont pas significativement différentes ( $P < 0,05$ ). Chaque valeur est la moyenne de trois répétitions.

**Figure 142 : Niveau d'expression du gène *HbPIPlike* dans les feuilles chez trois clones à métabolisme contrasté soumis à un traitement éthylène.**



Gène étudié	Clone	Traitement			
		Contrôle 15min	Blessure 15min	Contrôle 4h	Blessure 4h
<i>HbPIP-like</i>	PB217	0,23±0,15 <sup>bc</sup>	0,02±0,02 <sup>c</sup>	0,25±0,12 <sup>bc</sup>	1,73±0,35 <sup>a</sup>
	PB260	0,08±0,09 <sup>c</sup>	0,06±0,02 <sup>c</sup>	0,21±0,21 <sup>c</sup>	1,44±0,24 <sup>a</sup>
	RRIM600	0,13±0,14 <sup>c</sup>	0,05±0,03 <sup>c</sup>	0,13±0,08 <sup>c</sup>	0,42±0,24 <sup>b</sup>

Test de Fischer LSD. Toutes les valeurs ayant la même lettre ne sont pas significativement différentes ( $P < 0,05$ ). Chaque valeur est la moyenne de trois répétitions.

**Figure 15 : Niveau d'expression du gène *HbPIPlike* dans les feuilles chez trois clones à métabolisme contrasté soumis à la blessure.**

## 2) Analyse par Q-PCR de l'expression différentielle de gènes dans les feuilles entre trois clones à métabolisme contrasté

Il s'agit de valider l'expression de trois gènes obtenue dans une précédente expérience par *Reverse Northern* (Gramdi, 2006). L'objectif étant d'obtenir des profils d'expression permettant de discriminer les trois clones à métabolisme contrasté qui sont ici étudiés.

### a. *Aquaporin Like Protein (HbPIP-like)*

#### **Tableau 12 : Expression du gène HbPIP-like dans les feuilles obtenue par *Reverse Northern* chez trois clones à métabolisme contrasté en fonction des traitements blessure et éthylène (Gramdi, 2006)**

Les données représentent la moyenne de l'intensité de deux spots pour l'expression d'un gène donné ramenée à celle de l'actine. L'analyse est faite sur 2 répétitions biologiques.

	PB 217 Feuille				RRIM 600 Feuille		PB 260 Feuille		
	T <sub>0</sub>	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> +4h	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> +24h	Bl+15min	T <sub>0</sub>	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> +4h	T <sub>0</sub>	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> +4h	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> +8h
aquaporin-like protein [Petunia x hybrida]	4.06	0.88	0.88	1.93	5.50	2.79	1.44	4.31	7.45

C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> = traitement à l'éthylène

Bl = Blessure

T<sub>0</sub> = Témoin prélevé au moment de l'injection d'éthylène

#### Traitement éthylène :

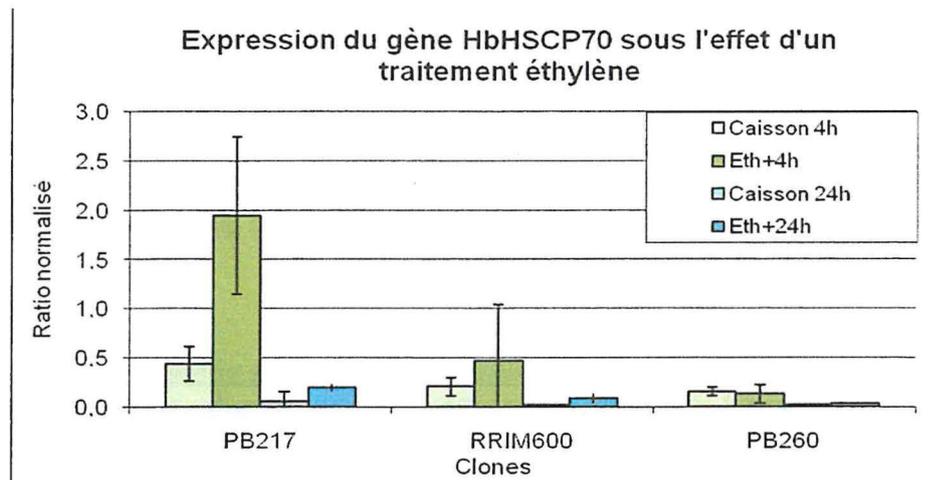
L'analyse graphique des résultats obtenus par Q-PCR (Figure 14) met en évidence chez PB217 une augmentation de l'expression du gène *HbPIP-like* 24h après traitement à l'éthylène. Cette augmentation, de 4,5 fois par rapport au témoin, s'avère significative à l'analyse statistique.

Parallèlement, aucune variation significative n'a lieu chez les clones RRIM600 et PB260, que ce soit 4h ou 24h après traitement à l'éthylène. La forte variabilité biologique retrouvée dans ces données vient en partie expliquer ces résultats. Ainsi, le coefficient de variation s'élève à 83% chez RRIM600, 24h après traitement à l'éthylène, et 88% chez PB260 pour les mêmes conditions de stress.

Ces résultats sont contraires à ceux obtenus par *Reverse Northern* (Tableau 12), qui montrent une diminution de l'expression du gène chez PB217, et ce dès 4h après injection d'éthylène. De même, chez PB260, une augmentation de l'expression d'*HbPIP-like* est visible après 4h de traitement et se poursuit 8h plus tard, alors qu'aucune variation significative n'a été observée par Q-PCR. Cependant le manque de données 24h après traitement chez ce clone ne permet pas de conclusion. De même chez RRIM600, pour lequel on ne dispose de données que pour 4h après traitement à l'éthylène. La diminution d'expression à ce point de cinétique semble cependant concorder avec l'analyse graphique des résultats de Q-PCR.

#### Traitement blessure :

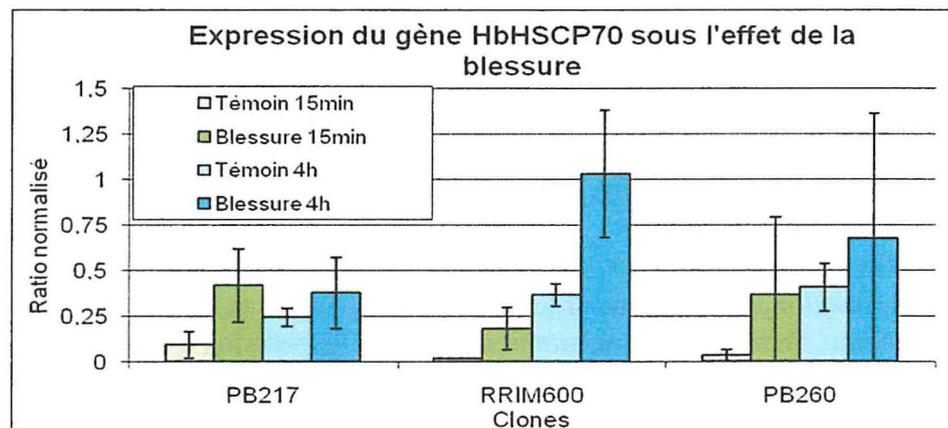
D'après l'analyse graphique de la figure 15 le gène *HbPIP-like* semble répondre à la blessure chez PB217 et PB260, 4h après traitement. En effet l'expression du gène augmente d'environ 7 fois par rapport au témoin correspondant, et ce chez les deux clones. La faible variabilité observée au sein des répétitions biologiques pour ces deux points de cinétique (coefficient de variation de 15% et 20% respectivement pour PB217 et PB260) vient renforcer



Gène étudié	Clone	Traitement			
		Témoin caisson 4h	Ethylène 4h	Témoin caisson 24h	Ethylène 24h
<i>HbHSCP70</i>	PB217	0,44±0,17 <sup>b</sup>	1,95±0,8 <sup>a</sup>	0,06±0,1 <sup>b</sup>	0,2±0,04 <sup>b</sup>
	PB260	0,16±0,05 <sup>b</sup>	0,13±0,09 <sup>b</sup>	0,02±0,01 <sup>b</sup>	0,03±0,01 <sup>b</sup>
	RRIM600	0,21±0,1 <sup>b</sup>	0,47±0,58 <sup>b</sup>	0,02±0,004 <sup>b</sup>	0,08±0,05 <sup>b</sup>

Test de Fischer LSD. Toutes les valeurs ayant la même lettre ne sont pas significativement différentes ( $P < 0,05$ ). Chaque valeur est la moyenne de trois répétitions.

**Figure 16 : Niveau d'expression du gène *HbHSCP70* dans les feuilles chez trois clones à métabolisme contrasté soumis à un traitement éthylène.**



Gène étudié	Clone	Traitement			
		Contrôle 15min	Blessure 15min	Contrôle 4h	Blessure 4h
<i>HbHSCP70</i>	PB217	0,09±0,07 <sup>de</sup>	0,42±0,2 <sup>b</sup>	0,24±0,05 <sup>bcd</sup>	0,38±0,2 <sup>b</sup>
	PB260	0,03±0,03 <sup>de</sup>	0,13±0,001 <sup>cde</sup>	0,41±0,13 <sup>b</sup>	0,28±0,002 <sup>bcd</sup>
	RRIM600	0,02±0,002 <sup>e</sup>	0,18±0,12 <sup>bcd</sup>	0,37±0,06 <sup>bcd</sup>	1,03±0,35 <sup>a</sup>

Test de Fischer LSD. Toutes les valeurs ayant la même lettre ne sont pas significativement différentes ( $P < 0,05$ ). Chaque valeur est la moyenne de trois répétitions.

**Figure 17 : Niveau d'expression du gène *HbHSCP70* dans les feuilles chez trois clones à métabolisme contrasté soumis à la blessure.**

cette hypothèse. L'analyse statistique met bien en évidence une différence significative des résultats pour ces clones ainsi que pour RRIM600, 4h après blessure (augmentation de 3,3 fois par rapport au témoin).

Chez les trois clones, on peut constater qu'il y a une légère diminution de l'expression du gène 15 minutes après la blessure, non significative cependant. Il est donc nécessaire, pour voir une éventuelle différence, d'effectuer les prélèvements aux alentours de 4h après traitement. Dans l'analyse par *Reverse Northern* nous ne disposons que d'une seule donnée pour PB217, 15 minutes après la blessure, qui met également en évidence une diminution de l'expression du gène étudié.

*b. Heat Shock Cognate Protein 70 (HbHSCP70)*

**Tableau 13Z: Expression du gène HbHSCP70 dans les feuilles obtenue par *Reverse Northern* chez trois clones à métabolisme contrasté en fonction des traitements blessure et éthylène (Gramdi, 2006)**

	PB 217 Feuille				RRIM 600 Feuille		PB 260 Feuille	
	T <sub>0</sub>	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> +4h	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> +24h	Bl+15min	T <sub>0</sub>	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> +4h	T <sub>0</sub>	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> +4h
70 kDa heat shock cognate protein 2 [Vigna radiata]	2.26	0.50	0.50	0.77	1.90	1.73	1.91	2.37

Traitement éthylène :

Le gène HbHSCP70 semble répondre de manière transitoire à la stimulation éthylénique chez PB217. En effet on peut observer sur l'analyse graphique (Figure 16) que cette expression est fortement stimulée 4 heures après traitement. Malgré un coefficient de variation de 40%, ce gène est, dans ces conditions, 4,4 fois surexprimé en moyenne par rapport au témoin correspondant, ce qui n'est pas négligeable. L'analyse statistique révèle que cette augmentation est bien significative. *HbHSCP70* semble par la suite réprimé mais reste toutefois surexprimé de 3,3 fois par rapport au témoin 24h, bien que de manière non significative.

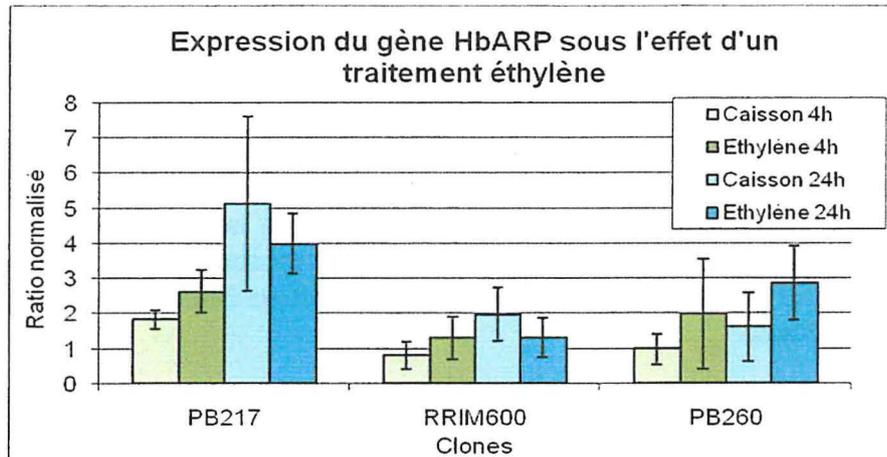
Chez RRIM600 cette expression transitoire semble nettement moins marquée, d'autant plus que le coefficient de variation accompagnant cette série de données dépasse les 100%. Chez PB260 aucune variation notable ne peut être observée graphiquement. Statistiquement aucune des variations énoncées précédemment ne s'avère significative.

Les résultats de l'analyse par *Reverse Northern* (Tableau 13) ne montrent pas les mêmes profils que la Q-PCR. Pour le clone PB217, le traitement à l'éthylène n'induit aucune augmentation de l'expression de *HbHSCP70*. Aucun phénomène transitoire n'est observable. Au contraire l'expression de ce gène semblerait même réprimée dès 4 heures après injection. En ce qui concerne les clones PB260 et RRIM600, on ne dispose ici aussi que des données au point de cinétique 4h après traitement.

Traitement blessure :

D'après l'analyse graphique (Figure 17), la blessure semblerait avoir un impact sur l'expression du gène *HbHSCP70* chez le clone RRIM600, 4h après traitement, ce qui est confirmé par l'analyse statistique. Autre évolution notable : chez le clone PB217, l'expression de ce gène augmente de 4,6 fois, 15 minutes après la blessure, variation également significative. Chez PB260, il semble y avoir une diminution de l'expression du gène 4h après blessure. Cependant pour ce clone aucune variation significative n'est observée.

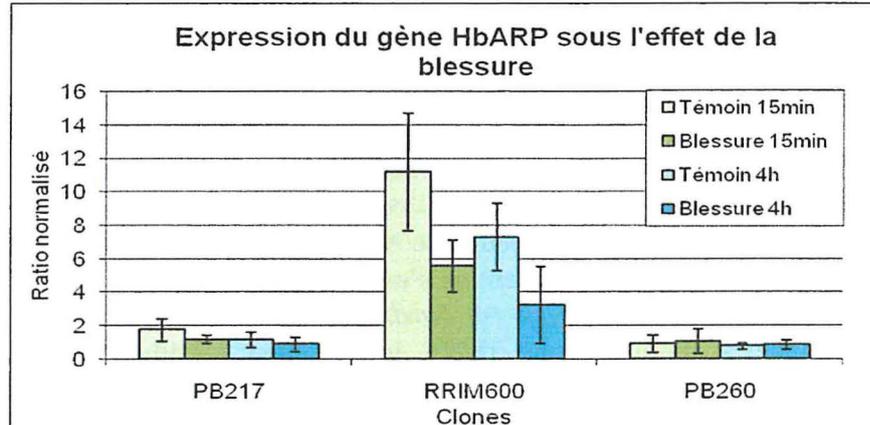
L'analyse *Reverse Northern*, quant à elle, indique une répression de l'expression de ce gène 15 minutes après blessure chez PB217, contrairement aux résultats de Q-PCR. Ici



Gène étudié	Clone	Traitement			
		Témoin caisson 4h	Ethylène 4h	Témoin caisson 24h	Ethylène 24h
<i>HbARP</i>	PB217	1,83±0,25 <sup>cde</sup>	2,62±0,61 <sup>bcde</sup>	5,13±2,47 <sup>a</sup>	4±0,86 <sup>abc</sup>
	PB260	0,98±0,44 <sup>de</sup>	1,99±1,57 <sup>cde</sup>	1,62±0,98 <sup>cde</sup>	2,86±1,06 <sup>bcd</sup>
	RRIM600	0,80±0,39 <sup>e</sup>	1,30±0,6 <sup>cde</sup>	1,97±0,76 <sup>cde</sup>	1,7±0,56 <sup>cde</sup>

Test de Fischer LSD. Toutes les valeurs ayant la même lettre ne sont pas significativement différentes ( $P < 0,05$ ). Chaque valeur est la moyenne de trois répétitions.

**Figure 18 : Niveau d'expression du gène *HbARP* dans l'écorce chez trois clones à métabolisme contrasté soumis à un traitement éthylène.**



Gène étudié	Clone	Traitement			
		Contrôle 15min	Blessure 15min	Contrôle 4h	Blessure 4h
<i>HbARP</i>	PB217	1,753±0,66 <sup>fg</sup>	1,176±0,248 <sup>fg</sup>	1,168±0,441 <sup>fg</sup>	0,896±0,413 <sup>g</sup>
	PB260	0,922±0,514 <sup>g</sup>	1,063±0,76 <sup>g</sup>	0,767±0,187 <sup>g</sup>	0,867±0,274 <sup>g</sup>
	RRIM600	11,165±3,532 <sup>a</sup>	5,548±1,574 <sup>bc</sup>	7,294±2,019 <sup>b</sup>	3,251±2,283 <sup>def</sup>

Test de Fischer LSD. Toutes les valeurs ayant la même lettre ne sont pas significativement différentes ( $P < 0,05$ ). Chaque valeur est la moyenne de trois répétitions.

**Figure 19 : Niveau d'expression du gène *HbHSCP70* dans l'écorce chez trois clones à métabolisme contrasté soumis à la blessure.**

encore, il n'est pas possible de comparer les résultats des deux techniques en raison des données manquantes il n'est pas possible de comparer les résultats des deux techniques en raison des données manquantes.

### c. *HbACSF2*

Le gène *HbACSF2* n'a pas pu être cloné, les différents couples d'amorces utilisés pour son amplification n'étant pas spécifiques. Ceci est très certainement dû au fait que ce gène appartient à une famille multigénique.

## 3) Analyse de l'expression de facteurs de transcription dans les écorces

L'objectif de cette partie est d'étudier l'expression de gènes codant des facteurs de transcription susceptibles de jouer un rôle important dans la régulation de gènes de réponse à l'éthylène. Ils ont été identifiés comme intervenant dans la réponse à l'éthylène dans les banques SSH mises en place dans de précédentes études (Lefrançois, 2004). La technique de *Reverse Northern* n'a cependant mis en évidence aucune variation significative de ces gènes sous traitement à l'éthylène. Cette régulation est peut-être trop faible pour être identifiable par *MacroArray*, une analyse plus fine de leur expression a donc été envisagée par Q-PCR.

Comme dans la partie précédente, les résultats sont analysés statistiquement grâce au test de Fischer LSD.

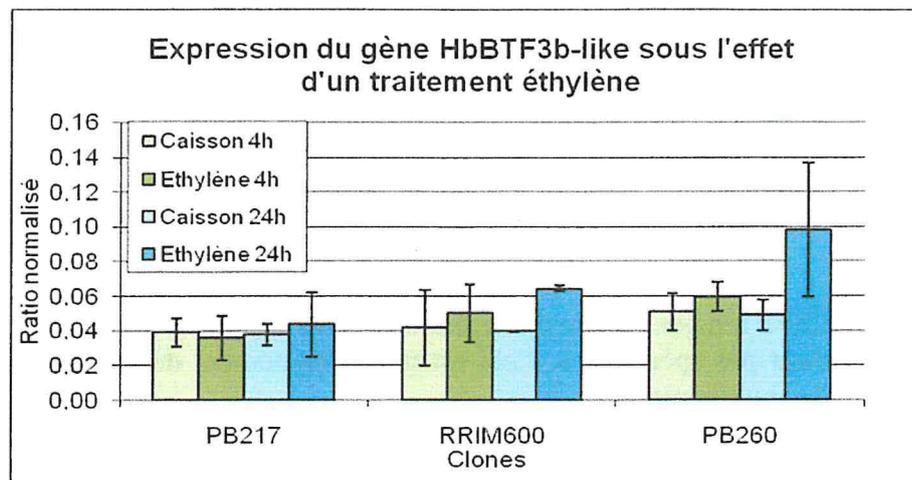
### a. *Auxin Repressed Protein (HbARP)*

#### Traitement éthylène :

L'injection d'éthylène ne semble avoir aucun effet notable sur l'expression du gène *HbARP* chez aucun des trois clones (Figure 18). Graphiquement et statistiquement, aucune variation significative ne peut être observée entre les plants témoins et les plants traités correspondant. En revanche, l'analyse statistique met en évidence une augmentation significative de l'expression de ce gène entre le témoin caisson 4h et le témoin caisson 24h chez PB217. Chez ce clone, ce gène serait donc sensible au stress généré par la mise en caisson. Cela a notamment déjà été observé dans de précédentes études concernant d'autres gènes.

#### Traitement blessure :

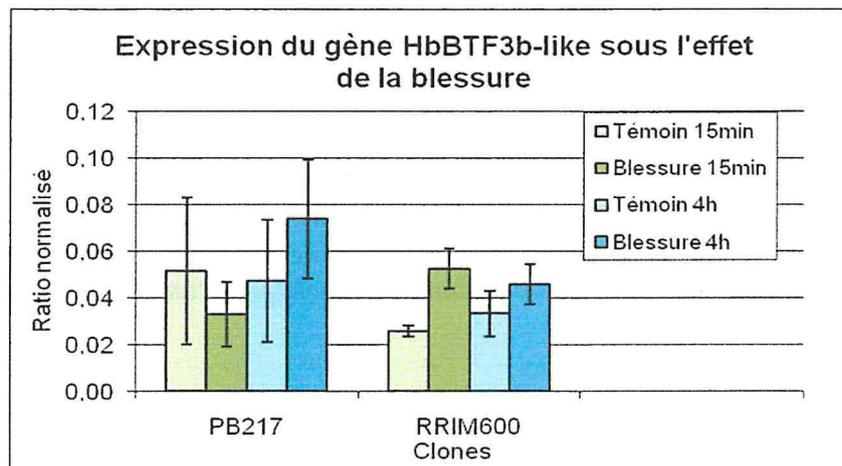
Chez les clones PB217 et PB260, aucune variation significative de l'expression du gène *HbARP* n'est mise en évidence dans les analyses graphique (Figure 19) et statistique. Chez RRIM600 on peut constater une diminution de son expression de 2 fois par rapport au témoin dès 15 minutes après la blessure. Cette diminution significative se poursuit jusqu'à au moins 4h après traitement. Il est intéressant de noter que chez RRIM600, ce gène est fortement exprimé chez les témoins utilisés pour la blessure en comparaison à ceux utilisés pour le traitement éthylène. En effet, si l'on observe le témoin caisson 4h et le témoin blessure 4h, on constate qu'il existe une différence significative entre ces deux niveaux d'expression. A nouveau, le caisson semble avoir un impact sur ce gène, bien que différent de celui observé précédemment. Chez RRIM600, le gène ARP serait réprimé par le stress causé lors de la mise en caisson.



Gène étudié	Clone	Traitement			
		Témoin caisson 4h	Ethylène 4h	Témoin caisson 24h	Ethylène 24h
<i>HbBTF3b-like</i>	PB217	0,04±0,01 <sup>bc</sup>	0,04±0,01 <sup>c</sup>	0,04±0,01 <sup>bc</sup>	0,04±0,02 <sup>bc</sup>
	PB260	0,05±0,01 <sup>bc</sup>	0,06±0,01 <sup>bc</sup>	0,05±0,01 <sup>bc</sup>	0,1±0,002 <sup>a</sup>
	RRIM600	0,04±0,02 <sup>bc</sup>	0,05±0,02 <sup>bc</sup>	0,04±0,001 <sup>bc</sup>	0,06±0,04 <sup>c</sup>

Test de Fischer LSD. Toutes les valeurs ayant la même lettre ne sont pas significativement différentes ( $P < 0,05$ ). Chaque valeur est la moyenne de trois répétitions.

**Figure 20 : Niveau d'expression du gène *HbBTF3b-like* dans l'écorce chez trois clones à métabolisme contrasté soumis à un traitement éthylène.**



Gène étudié	Clone	Traitement			
		Contrôle 15min	Blessure 15min	Contrôle 4h	Blessure 4h
<i>HbBTF3b-like</i>	PB217	0,05±0,032 <sup>ab</sup>	0,03±0,01 <sup>b</sup>	0,05±0,03 <sup>ab</sup>	0,07±0,03 <sup>a</sup>
	PB260				
	RRIM600	0,03±0,002 <sup>b</sup>	0,05±0,01 <sup>ab</sup>	0,03±0,01 <sup>ab</sup>	0,05±0,01 <sup>ab</sup>

Test de Fischer LSD. Toutes les valeurs ayant la même lettre ne sont pas significativement différentes ( $P < 0,05$ ). Chaque valeur est la moyenne de trois répétitions.

**Figure 21 : Niveau d'expression du gène *HbBTF3b-like* dans l'écorce chez trois clones à métabolisme contrasté soumis à la blessure.**

### *b. HbBTF3b-like*

Bien que les résultats de la Q-PCR montrent pour ce gène un épaulement des courbes de fusion, ce qui traduirait un problème de spécificité des amorces dessinées, les analyses d'expression de *HbBTF3b-like* sont tout de même présentées, la séquence des amplicons isolés étant conforme à celle du gène étudié (Annexe 6).

#### Traitement éthylène :

D'après l'analyse graphique (Figure 20), le gène *HbBTF3b-like* est exprimé au même niveau chez les plants témoins et les plants traités pour les clones PB217 et RRIM600. Seul le clone PB260 présente une augmentation significative de son expression 24h après traitement à l'éthylène. Son expression a en effet doublé en moyenne par rapport au témoin malgré 40% de variation biologique.

#### Traitement blessure :

Tout comme l'éthylène, la blessure n'a aucun impact significatif sur l'expression de ce gène pour les clones PB217 et RRIM600 (Figure 21). Pour le clone PB260, les données sont manquantes.

### *c. HbTF vicia faba et HbZFP*

Ces deux facteurs de transcription n'ont pas pu être clonés de manière spécifique : le plasmide isolé contenait un amplicon de séquence différente à celle recherchée.

## **V- DISCUSSION ET CONCLUSION**

### **1) Analyse des données d'expression de gènes**

Il existe plusieurs méthodes pour l'exploitation des résultats de qPCR (Wong et Medrano, 2005). Le modèle Pfaffl (Pfaffl *et al.*, 2002) avait dans un premier temps été choisi dans cette étude en raison de sa simplicité d'utilisation, de son accessibilité et de son référencement dans plusieurs publications scientifiques (Klitgaard *et al.*, 2006 ; Pöggeler *et al.*, 2006). Ce modèle se base sur l'utilisation du logiciel REST-384© et analyse les résultats à l'aide d'un test statistique de randomisation. Tout comme pour le test de Mann-Whitney, ce sont les ratios normalisés qui sont comparés pour leurs différences significatives. Ces ratios sont calculés à partir des Cp correspondant que l'on utilise comme données rentrantes du logiciel. Cependant le calcul effectué ne prend pas en compte les calibrateurs qui permettent la comparaison des résultats entre plaques. Si l'on voulait utiliser ce logiciel, il nous faudrait donc analyser tous les éléments à comparer sur une même plaque de q-PCR, afin qu'aucune variabilité ne soit imputable aux différentes plaques. Il aurait donc fallu réaliser les analyses en plaques 384 puits pour rentrer tous les échantillons à comparer. Cette démarche est d'ailleurs en cours au laboratoire.

### **2) Importance de la variabilité biologique dans les résultats de Q-PCR**

La variabilité observée entre répétitions biologiques peut parfois être très importante, ce qui vient fortement influencer l'interprétation des résultats. Cette analyse a été réalisée sur trois répétitions biologiques, ce qui est relativement faible. Un plus grand nombre de répétitions biologiques aurait permis d'accroître la fiabilité des résultats, voire de mettre en évidence des variations significatives qui ne le sont pas dans cette étude. Il faut cependant tenir compte du fait qu'une répétition biologique correspond à un jeune plant greffé cultivé jusqu'au développement complet de sa première unité de croissance. Il s'agit donc d'un système assez lourd à mettre en place, qui demande beaucoup de matériel biologique. De plus il a été estimé que si une quelconque variation d'expression était mise en évidence dans cette étude, elle serait d'autant plus significative que le nombre de répétitions biologiques est faible.

### **3) Les sources de variation de l'expression génique**

Le matériel biologique lui-même est probablement la première source de variation d'expression des gènes. En effet il existe une hétérogénéité naturelle entre les individus d'un même génotype qui peut varier lors de la mise en place du dispositif expérimental, en fonction du stade physiologique de la plante par exemple mais aussi du fait de l'influence du porte-greffe non clonal. Car bien que les échantillons aient été prélevés sur de jeunes arbres à un stade de développement bien précis, il y a inévitablement des différences d'état physiologique entre eux (feuilles plus ou moins vertes, plants plus ou moins vigoureux...). D'autre part les traitements sont réalisés à différentes périodes de l'année, par différentes personnes, les plants témoins et les plants traités correspondants n'étant pas forcément récoltés dans la même journée. Tous ces éléments sont, entre autres, susceptibles d'introduire de la variabilité au sein même du matériel biologique récolté.

Par ailleurs, de nombreuses étapes se dressent entre l'échantillonnage et la réalisation de la Q-PCR proprement dite, chacune d'elle pouvant introduire des erreurs expérimentales. Ainsi, la qualité et l'intégrité des ARN utilisés est indispensable pour obtenir des résultats exploitables (Fleige et Pfaffl, 2006). Parallèlement, la synthèse d'ADNc est une étape déterminante lors du processus de quantification. Différents facteurs peuvent intervenir sur l'efficacité de la rétro-transcription et de ce fait affecter les résultats de la PCR en temps réel. Par exemple, les oligonucléotides utilisés en tant qu'amorces pour la rétro-transcription peuvent affecter le niveau d'ADNc final. Ainsi, l'utilisation d'amorces spécifiques des gènes étudiés, d'oligo(dT) ou d'hexamères aléatoires aura un impact sur l'efficacité de la synthèse d'ADNc (Lekanne Deprez *et al.*, 2002).

#### 4) Comparaison des méthodes d'expression génique

Les analyses par Q-PCR réalisées dans cette étude ne permettent pas de valider les résultats obtenus par *Reverse Northern*, les résultats de ces deux méthodes étant difficilement comparables. En effet, des données sont manquantes dans l'analyse par *MacroArray*, ce qui diminue le nombre d'éléments de comparaison. Dans un deuxième temps, les témoins utilisés pour les traitements blessure et éthylène sont différents dans les deux études. Ainsi, dans l'analyse par *Reverse Northern*, un seul témoin est pris en compte pour l'ensemble des points réalisés en cinétique, et ce quel que soit le traitement : il s'agit d'échantillons prélevés au moment de la blessure ou de l'injection d'éthylène. Dans ce témoin n'est donc pas pris en compte l'évolution de l'expression des gènes au cours de la journée, ni même l'impact éventuel de la mise en caisson sur le plant étudié. De ce fait, les variations d'expression observées dans la précédente analyse ont pu être faussées par l'utilisation d'un témoin inapproprié. Parallèlement, les résultats obtenus par *Macro-Array* nécessitaient d'être appuyés par d'autres répétitions biologiques, ce qui a été fait lors de cette étude.

La PCR quantitative reste une méthode plus fiable et moins lourde à mettre en œuvre que la technique de *Macro-Array*. Elle nécessite également moins d'étapes, ce qui réduit le nombre d'erreurs pouvant survenir lors de sa réalisation. Par ailleurs, il s'agit d'une technique d'analyse plus fine. En effet, dans cette étude, des variations significatives de l'expression des gènes *HbARP* et *HbBTF3b-like* ont été mises en évidence alors qu'elles n'avaient pas été détectées par *MacroArray* précédemment. La Q-PCR est également plus spécifique que la *Reverse Northern* et permet, grâce aux courbes de fusion, de vérifier la spécificité des amplifications. Ainsi les résultats observés par *Macro-Array* peuvent résulter d'hybridations croisées au sein d'une même famille multigénique. Les gènes *HbPIP-like* et *HbHSCP70* ici étudiés font notamment partie de familles multigéniques. Ce phénomène a déjà été observé pour d'autres gènes, notamment pour *HbACO1*, qui code pour une enzyme intervenant dans la voie de biosynthèse de l'éthylène.

#### 5) Variabilité génotypique de la réponse aux stress

La caractérisation de l'expression de plusieurs gènes a permis d'identifier un effet génotypique marqué en réponse aux différents stress réalisés.

Sur les trois gènes étudiés pour leurs variations d'expression différentielle en réponse aux traitements, seuls deux ont pu être analysés (*HbPIP-like* et *HbHSCP70*). Bien que ces gènes présentent des profils d'expression différents selon le clone étudié, les résultats obtenus ne suffisent pas à discriminer les trois clones à métabolisme contrasté. Il serait possible

**Tableau 14 : Tableau récapitulatif des variations d'expression des différents gènes sous l'effet des traitements éthylène et blessure**

\*=variation significative

ND = non déterminé

Gène	Clone	Ethylène 4h	Ethylène 24h	Blessure 15min	Blessure 4h
<i>HbPIP-like</i>	PB217	↗	↗*	↘	↗*
	PB260	↗	↗	↘	↗*
	RRIM600	↘	↗	↘	↗*
<i>HbHSCP70</i>	PB217	↗*	↗	↗*	↗
	PB260	↘	↗	↗	↘
	RRIM600	↗	↗	↗	↗*
<i>HbARP</i>	PB217	↗	↘	↘	↘
	PB260	↗	↗	↗	↗
	RRIM600	↗	↘	↘*	↘*
<i>HbBTF3b-like</i>	PB217	↘	↗	↘	↗
	PB260	↗	↗*	ND	ND
	RRIM600	↗	↗	↗	↗

d'identifier les clones PB217 et RRIM600 en étudiant l'expression du gène *HbHSCP70* sous l'effet des traitements éthylène et blessure, au point de cinétique 4h, mais le clone PB260 ne présente pas de réponse spécifique des gènes étudiés sous ces conditions (Tableau 14). En effet, la seule variation significative observée chez ce clone est celle du gène *HbPIP-like*, 4h après la blessure. Or les trois clones répondent de manière significative à ce traitement par une augmentation de l'expression de ce gène. Le clone B260 ne peut ainsi être identifié que par élimination.

Il est possible cependant de discriminer les trois clones à métabolisme contrasté si l'on associe à cette analyse l'étude des gènes codant les facteurs de transcription. En effet le gène *HbBTF3b-like* répond de manière significative 24h après traitement à l'éthylène chez le clone PB260 uniquement. Ainsi, l'étude des gènes *HbPIP-like*, *HbHSCP70* et *HbBTF3b-like* sous les traitements blessure (4h) et éthylène (24h) devrait permettre d'identifier ces 3 clones.

Le gène *HbARP*, quant à lui, ne semble régulé que chez le clone RRIM600, sous l'effet de la blessure, 15 minutes et 4h après traitement. Aucun impact du traitement éthylène n'est observé sur ce gène.

Ces facteurs de transcription sont susceptibles de réguler l'expression d'un ou plusieurs gènes de réponse à l'éthylène, c'est pourquoi il était intéressant d'étudier l'impact d'un traitement éthylène sur leur propre expression. Cependant, seul le gène *HbBTF3b-like* semble répondre de manière significative à ce traitement, et ce pour un clone seulement. Cette démarche fait d'ailleurs l'objet d'une thèse en cours, visant à analyser d'autres facteurs de transcription impliqués dans la signalisation de l'éthylène et l'acide jasmonique chez l'hévéa.

En plus d'une meilleure connaissance sur la physiologie moléculaire de l'hévéa en réponse aux stress, ces résultats ouvrent des perspectives nouvelles en termes de sélection. En effet, l'état physiologique d'un hévéa peut être analysé par un diagnostic latex dès l'état immature (arbres âgés de 2-3 ans). Cette méthode est basée sur l'analyse de 4 paramètres (extrait sec, teneurs en saccharose, en phosphore inorganique et en thiols). L'identification du métabolisme d'un clone à un stade précoce du développement par des gènes marqueurs de la réponse à l'éthylène, par exemple, permettrait de discriminer des descendances en sélection. Après une première étape d'identification de ces gènes marqueurs, il sera par la suite nécessaire de vérifier que l'expression de ces gènes est identique aux différents stades de développement de l'arbre. Enfin de nombreux métabolismes différents devront être analysés afin de confirmer qu'il s'agit bien de gènes marqueurs. Le cas échéant, ceux-ci pourront être utilisés lors des schémas de sélection et permettront un gain de temps considérable lors de l'identification du métabolisme de l'arbre étudié.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abraham P.D., Tayler R.S.** (1967): Stimulation of latex flow in *Hevea brasiliensis*. *Expl Agric.* **3**: p. 1-12.
- Alonso J.M., Hirayama T., Roman G., Nourizadeh S., Ecker J.R.** (1999): EIN2, a bifunctional transducer of ethylene and stress responses in *Arabidopsis*. *Science*, **284**(5423): p. 2148-52.
- 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**(3): p. 979-86.
- Bleecker A.B., Kende H.** (2000): Ethylene: a gaseous signal molecule in plants. *Annu Rev Cell Dev Biol.* **16**: p. 1-18.
- Brzozowska-Hanower J., Hanower P., Lioret C.** (1978): Etude du mécanisme de la coagulation du latex d'*Hevea brasiliensis*. II. Systèmes enzymatiques impliqués dans le processus : 1) Phenol-oxydases. *Physiol. Vég.*, **16**(2): p231-254.
- Bunn C.W.** (1942): Molecular structure and rubber-like elasticity. The crystal structures of Gutta-percha rubber and polychloropren. *Proc. R. Sac. A.* **180**(40).
- Bustin S.A.** (2000): Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology.* **25**: 169-193.
- Carballo E., Lai W.S., Blackshear P.J.** (1998): Feedback inhibition of macrophage tumor necrosis factor-alpha production by tristetraprolin. *Science* **281**(5379): p.1001-5.
- Chao Q., Rothenberg M., Solano R., Roman G., Terzaghi W., Ecker J.R.** (1997): Activation of the ethylene gas response pathway in *Arabidopsis* by the nuclear protein ETHYLENE-INSENSITIVE3 and related proteins. *Cell.* **89**(7): p1133-44.
- Chen Y.F., Etheridge N., Schaller G.E.** (2005): Ethylene signal transduction. *Ann Bot (Lond).* **95**(6): p. 901-15.
- Chen Y.F., Randlett M.D., Findell J.L., Schaller G.E.** (2002): Localization of the ethylene receptor ETR1 to the endoplasmic reticulum of *Arabidopsis*. *J Biol Chem.* **277**(22): p. 19861-6.
- Compagnon P.** (1986): Le caoutchouc naturel. G.P. Maisonneuve et Larose ed.
- Coupé M., Chrestin H.** (1989): Physico-chemical and biochemical mechanisms of hormonal (Ethylene) stimulation, in *Physiology of rubber tree latex : the laticiferous cell and latex, a model of cytoplasm*, J. d'Auzac, J.L. Jacob and H. Chrestin Editors. Boca Raton : CRC Press.
- Coupé M., Lambert C.** (1977): Absorption of citrate by the lutoids of latex and rubber production by *hevea*. *Phytochemistry.* **16**: p. 455-458.
- d'Auzac J., Jacob J.L., Prevot J.C., Clément A., Gallois R., Chrestin H., Lacote R., Pujade-Renaud V., Gobet E.** (1997) : The regulation of cis-polyisoprene production (natural rubber) from *Hevea Brasiliensis*. *Recent. Res. Devel. In Plant Physiol.* p. 273-332.
- d'Auzac J., Jacob J.L.** (1989): The composition of latex from *Hevea brasiliensis* as a laticiferous cytoplasm, in *Physiology of rubber tree latex: the laticiferous cell and latex, a model of cytoplasm*, J. d'Auzac, J.L. Jacob and H. Chrestin Editors. Boca Raton: CRC Press.

- de Fäy E., Jacob J.L.** (1989): Anatomical organization of the laticiferous system in the bark, in *Physiology of rubber tree latex: the laticiferous cell and latex, a model of cytoplasm*. J. d'Auzac, J.L. Jacob and H. Chrestin Editors. Boca Raton: CRC Press. p. 4-14
- de Jonge P.** (1955): Stimulation of yield in *Hevea brasiliensis*. III – Further observations on the effects of yield stimulation. *K. Rubber. Res. Inst. Malaya*. 14 : p. 383.
- Dennis M.S., Light D.R.** (1989): Rubber elongation factor from *Hevea brasiliensis*, in *Proceed Nat Rub Res Ass Jubilee Conf*. Cambridge.
- Dickenson P.B.** (1964): The ultrastructure of latex vessel of *Hevea brasiliensis*, in *Proceed Nat Rub Res Ass Jubilee Conf*. Cambridge.
- Fleige S., Pfaffl M.W.** (2006): RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Molecular Aspects of Medicine* 27: 126-139.
- Frey-Wyssling A.** (1929): Microscopics investigations in the occurrence of resins in hevea latex. *Arch. V. Rubbercult.* p 392-412.
- Ge L., Liu J.Z., Wong S.W., 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 and Environment*. 23: p. 1169-1182.
- 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(12) : p. 9278-83.
- Glover J.R., Lindquist S.** (1998): Hsp104, Hsp70 and Hsp40: a novel chaperone system that rescues previously aggregated proteins. *Cell*. 94(1) : p. 73-82.
- Golub M.A., Fuqua S.A., Bhacca N.S.** (1962): High Resolution Nuclear Magnetic Resonance Spectra of Various Polyisoprenes. *Journ Am chem. Soc.* 84 : p. 4981-4984.
- Gramdi S.** (2006) : Caractérisation des gènes de réponse à l'éthylène par Reverse Northern sur un clone à fort métabolisme PB260 chez *Hevea brasiliensis*. Université Montpellier 2, Sciences et techniques/CIRAD : Montpellier.
- Guilfoyle T., Hagen G., Ulmasov T., Murfett J.** (1998): How does auxin turn on genes? *Plant Physiol*. 118(2): p.341-7.
- Haan Homans L.N.S., Van Gils G.E.** (1949): Fresh hevea latex: a complex colloidal system, in *Proceed. 2<sup>nd</sup> Rubb. Techn. Conf. London*.
- Hanower P., Brzozowska J., Lioret C.** (1976): Etude du mécanisme de la coagulation du latex d'*Hevea brasiliensis* I. Facteur agissant sur la coagulation. *Physiol. Vég.* 14: p. 677-693.
- Hua J., Meyerowitz E.M.** (1998): Ethylene responses are negatively regulated by a receptor gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Cell*. 94(2) : p. 261-71.
- Huang Y., Li H., Hutchison C.E., Laskey J., Kieber J.J.** (2003): Biochemical and functional analysis of CTR1, a protein kinase that negatively regulates ethylene signaling in *Arabidopsis*. *Plant J*. 33(2) : p.221-33.
- Jacob J.L., Prévôt J.C., d'Auzac J.** (1982): Physiological activators of invertase from *Hevea brasiliensis* latex. *Phytochemistry*. 21: p. 851-858.

**Jacob J.L., Prévôt J.C., Kekwick R.G.O.** (1989): General metabolism of *Hevea brasiliensis* latex (with the exception of isoprenoid anabolism), in *Physiology of rubber tree latex : the laticiferous cell and latex, a model of cytoplasm*, J. d'Auzac, J.L. Jacob and H. Chrestin Editors. Boca Raton: CRC Press.

**Jacob, J.L., Prévôt J.C., Lacrotte R.** (1994) : L'encoche sèche chez *Hevea brasiliensis*. *Plantations, recherche, développement*. p. 15-21.

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

**Johanson U., Karlsson M., Johansson I., Gustavsson S., Sjövall S., Fraysse L., Weig A.R., Kjellbom P.** (2001): The complete set of genes encoding major intrinsic proteins in plants. *Plant Physiol*. 126(4): p. 1358-69.

**Kaldenhoff R., Fischer M.** (2006): Aquaporins in plants. *Acta Physiol (Oxf)*. 187(1-2): p. 169-76.

**Kekwick, R.G.O.** (1989): The formation of polyisoprenoids in *Hevea* latex, in *Physiology of rubber tree latex*, J. d'Auzac, J.L. Jacob and H. Chrestin Editors. Boca Raton: CRC Press.

**Kende H.** (1993): Ethylene biosynthesis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. 44: p. 283-307

**Klitgaard K., Jensen T.K., Angen O., Boye M.** (2006): Measurement of bacterial gene expression in vivo by laser capture microdissection and quantitative real-time RT-PCR. *Journal of Microbiological Methods*. 69: 414-416.

**Kuswanhadi:** Isolement et caractérisation des gènes ACS et ACO impliqués dans la biosynthèse de l'éthylène chez *Hevea brasiliensis*, in Académie de Montpellier. 2006, Université de Montpellier II, Sciences et techniques du Languedoc.

**Lacrotte R., Van de Sype H., Chrestin H.** (1985) : Influence de l'éthylène sur l'utilisation du saccharose exogène des laticifères d'*Hevea brasiliensis*, proposition d'un mécanisme d'action. *Physiol vég.* 23: p. 187-198.

**Lee G.J., Pokala N., Vierling E.** (1995): Structure and in vitro molecular chaperone activity of cytosolic small heat shock proteins from pea. *J Biol Chem*. 270(18): p. 10432-8.

**Lekanne Deprez R.H., Fijnvandraat A.C., Ruijter J.M., Moorman A.F.** (2002): Sensitivity and accuracy of quantitative real-time polymerase chain reaction using SYBR green I depends on cDNA synthesis conditions. *Analytical Biochemistry* 307: p. 63-69.

**Light D.R., Dennis M.S.** (1989): Purification of a prenyltransferase that elongates cis-polyisoprene rubber from the latex of *Hevea brasiliensis*. *J Biol Chem*. 264(31): p. 18589-97.

**Llop-Tous I., Barry C.S., Grierson D.** (2000): Regulation of ethylene biosynthesis in response to pollination in tomato flowers. *Plant Physiol*. 123(3): p. 971-8.

**Muday G.K.** (2001): Auxins and Tropisms. *J Plant Growth Regul*. 20: p.226-243.

**Nakhoul N.L., Hering-Smith K.S., Abdulnour-Nakhoul S.M., Hamm L.L.** (2001): Transport of NH<sub>3</sub>/NH in oocytes expression aquaporin-1. *Am J Physiol Renal Physiol*. 281(2): p.F255-63.

**Park S., Han K.H.** (2003): An auxin-repressed gene (RpARP) from black locust (*Robinia pseudoacacia*) is posttranscriptionally regulated and negatively associated with shoot elongation. *Tree Physiol.* **23**(12): p. 815-23.

**Pfaffl M.W., Horgan G.W., Dempfle L.** (2002): Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research.* **30**(9)e36.

**Pöggeler S., Nowrousian M., Ringelberg C., Loros J.J., Dunlap J.C., Kück U.** (2006): Microarray and real-time PCR analyses reveal mating type-dependent gene expression in a homothallic fungus. *Mol Gen Genomics.* **275**: p. 492-503.

**Ravanel S., Gakiere B., Job D., Douce R.** (1998): The specific features of methionine biosynthesis and metabolism in plants. *Proc Natl Acad Sci USA.* **95**(13): p. 7805-12.

**Solano R., Stepanova A., Chao Q., Ecker J.R.** (1998): Nuclear events in ethylene signaling: a transcriptional cascade mediated by ETHYLENE-INSENSITIVE3 and ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1. *Genes Dev.* **12**(23): p.3703-14.

**Serier J.B., Van Dyk A.** (1983): Utilisations du bois d'hévéa *Hevea brasiliensis* = Uses of rubber-tree wood *Hevea brasiliensis*. *Revue Générale des Caoutchoucs et Plastiques*, **60**(633): 117-118.

**Southorn W.A., Yip E.** (1968): Latex flow studies III. Electrostatic consideration in the colloidal stability of fresh hevea latex. *Journ R.R.I.M.* **20**(4): p. 201-215.

**Sung D.Y., Vierling E., Guy C.L.** (2001): Comprehensive expression profile analysis of the *Arabidopsis* Hsp70 gene family. *Plant Physiol.* **126**(2): p. 789-800.

**Tupy J.** (1973): The regulation of invertase activity in the latex of *Hevea brasiliensis*. The effects of growth regulators, bark wounding and latex tapping. *J Exp Bot.* **24**: p. 516-523.

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

**Uehlein N., Lovisolo C., Siefritz F., Kaldenhoff R.** (2003): The tobacco aquaporin NtAQP1 is a membrane CO<sub>2</sub> pore with physiological functions. *Nature.* **425**(6959): p. 734-7.

**Van de Sype H.** (1984): The dry cut syndrome of *Hevea brasiliensis*. Evolution, agronomical and physiological aspects, in *Colloque Exploitation-Physiologie de l'Hévéa*. Montpellier: IRCA/GERDAT.

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

**Wong M.L., Medrano J.F.** (2005): Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques.* **39**(1): p 1-11.

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

**Zheng X.M., Black D., Chambon P., Egly J.M.** (1990): Sequencing and expression of complementary DNA for the general transcription factor BTF3. *Nature.* **344**(6266): p. 556-9.

**Zheng X.M., Moncollin V., Egly J.M., Chambon P.** (1987): A general transcription factor forms a stable complex with RNA polymerase B(II). *Cell.* **50**(3): p.361-8.

## ANNEXES

Annexe 1 : Extraction des ARN totaux

Annexe 2 : Carte du plasmide PCR2.1-TOPO

Annexe 3 : Clonage

Annexe 4 : Purification de plasmide grâce au kit Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System

Annexe 5 : Exploitation des résultats de PCR quantitative

Annexe 6 : Alignement pour la vérification de la séquence du plasmide BTF3b

## Annexe 1 : Extractions des ARN totaux

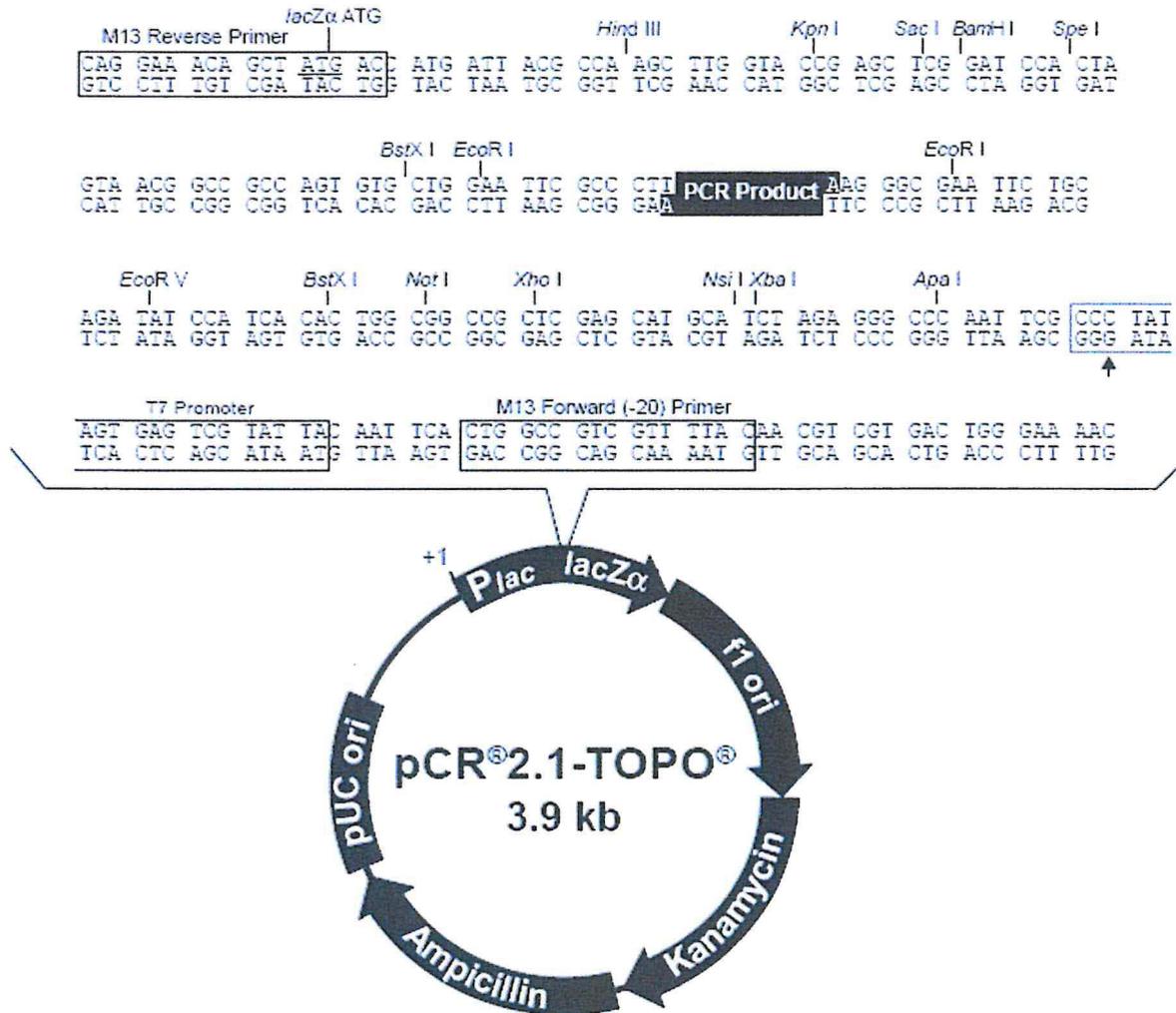
### Composition du tampon d'extraction :

Solution	Volume (mL)
Guanidine Thiocyanate	48
Sarcosine	2,64
PVP Chlorure de Césium	5,4
H <sub>2</sub> O sterile	2,52
β mercaptoethanol	0,6

### Composition des solutions mères :

Nom	Composants	Quantité	H <sub>2</sub> O qsp	Concentration	Conservation
Guanidine Thiocyanate	Guanidine Thiocyanate NaAc 3M, pH6	118,16g 2 mL	200 mL	1,25mM	obscurité
Sarcosine	Sarcosine	20g	100 mL	20%	4°C
PVP Chlorure de Césium	Polyvinyl pirrolidone Chlorure de Césium NaAc 3M, pH6	10g 95,97g 0,83 mL	100 mL	10% 5,7M	4°C

## Annexe 2 : Carte du plasmide PCR2.1-TOPO



### Comments for pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup> 3931 nucleotides

- LacZα fragment: bases 1-547
- M13 reverse priming site: bases 205-221
- Multiple cloning site: bases 234-357
- T7 promoter/priming site: bases 364-383
- M13 Forward (-20) priming site: bases 391-406
- f1 origin: bases 548-985
- Kanamycin resistance ORF: bases 1319-2113
- Ampicillin resistance ORF: bases 2131-2991
- pUC origin: bases 3136-3809

### Annexe 3: Clonage

#### Composition du milieu SOC (produit fournisseur livré avec les bactéries) :

SOB+ 20mM glucose

#### SOB :

2% Vegetable peptone

0.5% Yeast extract

10mM NaCl

2.5mM KCl

10mM MgCl<sub>2</sub>

10mM MgSO<sub>4</sub>

#### Préparation du milieu LB agar, Amp, IPTG, X-Gal :

Dissoudre 30g de LB Agar low salt dans 1 litre d'eau déminéralisée. Autoclaver le milieu ainsi préparé puis attendre que la gélose refroidisse à 60 °C.

Sous hotte bactériologique ajouter au milieu LB :

Produits	Concentration finale (mg/l)	Pour 250 mL (µL)	Pour 500 mL (µL)	Pour 1 l (µL)
Ampicilline à 200mg/mL	100	125	250	500
IPTG à 200mg/mL	200	250	500	1000
X-Gal à 20mg/mL	16	200	400	800

Bien mélanger et couler 25 mL par boîte de Pétri.

Laisser les boîtes s'équilibrer à température ambiante (se conserve au frigo 3-4 semaines)

## Annexe 4 : Purification de plasmide grâce au kit Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System



### III.A. Production of a Cleared Lysate

1. Harvest 1–5ml (high-copy-number plasmid) or 10ml (low-copy-number plasmid) of bacterial culture by centrifugation for 5 minutes at 10,000 × g in a tabletop centrifuge. Pour off the supernatant and blot the inverted tube on a paper towel to remove excess media.
2. Add 250µl of Cell Resuspension Solution and completely resuspend the cell pellet by vortexing or pipetting. It is essential to thoroughly resuspend the cells. If they are not already in a microcentrifuge tube, transfer the resuspended cells to a sterile 1.5ml microcentrifuge tube(s).



Note: To prevent shearing of chromosomal DNA, do not vortex after Step 2. Mix only by inverting the tubes.

3. Add 250µl of Cell Lysis Solution and mix by inverting the tube 4 times (do not vortex). Incubate until the cell suspension clears (approximately 1–5 minutes).

Note: It is important to observe partial clearing of the lysate before proceeding to addition of the Alkaline Protease Solution (Step 4); however, do not incubate for longer than 5 minutes.

4. Add 10µl of Alkaline Protease Solution and mix by inverting the tube 4 times. Incubate for 5 minutes at room temperature.



Alkaline protease inactivates endonucleases and other proteins released during the lysis of the bacterial cells that can adversely affect the quality of the isolated DNA. Do not exceed 5 minutes of incubation with Alkaline Protease Solution at Step 4, as nicking of the plasmid DNA may occur.

5. Add 350µl of Neutralization Solution and immediately mix by inverting the tube 4 times (do not vortex).
6. Centrifuge the bacterial lysate at maximum speed (around 14,000 × g) in a microcentrifuge for 10 minutes at room temperature.

### III.B. Plasmid DNA Isolation and Purification Protocols

Prepare plasmid DNA purification units by inserting one Spin Column into one 2ml Collection Tube for each sample.

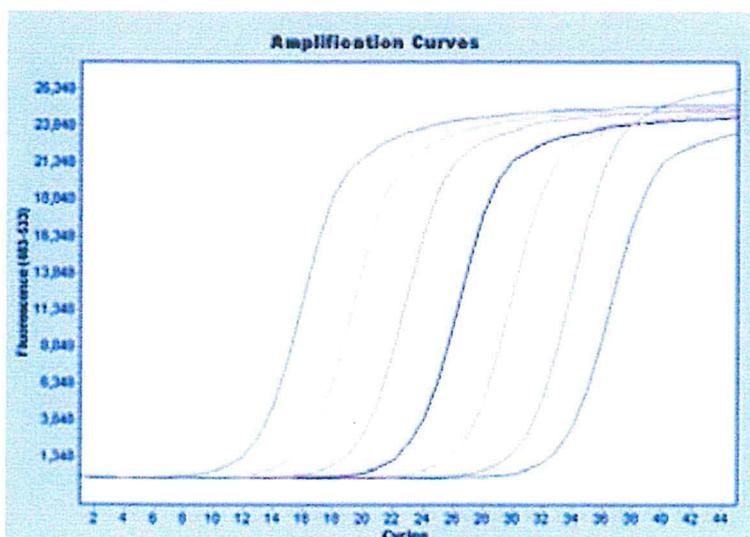
1. Transfer the cleared lysate (approximately 850µl, Section III.B, Step 6) to the prepared Spin Column by decanting. Avoid disturbing or transferring any of the white precipitate with the supernatant.  
**Note:** If the white precipitate is accidentally transferred to the Spin Column, pour the Spin Column contents back into a sterile 1.5ml microcentrifuge tube and centrifuge for another 5–10 minutes at maximum speed. Transfer the resulting supernatant into the same Spin Column that was used initially for this sample. The Spin Column can be reused but **only** for this sample.
2. Centrifuge the supernatant at maximum speed in a microcentrifuge for 1 minute at room temperature. Remove the Spin Column from the tube and discard the flowthrough from the Collection Tube. Reinsert the Spin Column into the Collection Tube.
3. Add 750µl of Column Wash Solution, previously diluted with 95% ethanol, to the Spin Column.
4. Centrifuge at maximum speed in a microcentrifuge for 1 minute at room temperature. Remove the Spin Column from the tube and discard the flowthrough. Reinsert the Spin Column into the Collection Tube.
5. Repeat the wash procedure using 250µl of Column Wash Solution.
6. Centrifuge at maximum speed in a microcentrifuge for 2 minutes at room temperature.
7. Transfer the Spin Column to a new, sterile 1.5ml microcentrifuge tube, being careful not to transfer any of the Column Wash Solution with the Spin Column. If the Spin Column has Column Wash Solution associated with it, centrifuge again for 1 minute at maximum speed.
8. Transfer the Spin Column to a new, sterile 1.5ml microcentrifuge tube.
9. Elute the plasmid DNA by adding 100µl of Nuclease-Free Water to the Spin Column. Centrifuge at maximum speed for 1 minute at room temperature in a microcentrifuge.
10. After eluting the DNA, remove the assembly from the 1.5ml microcentrifuge tube and discard the Spin Column.
11. DNA is stable in water without addition of a buffer if stored at -20°C or below. DNA is stable at 4°C in TE buffer. To store the DNA in TE buffer, add 1µl of 10X TE buffer to the 100µl of eluted DNA. Do not add TE buffer if the DNA is to be used for automated fluorescent sequencing.
12. Cap the microcentrifuge tube and store the purified plasmid DNA at -20°C or below.

## Annexe 5 : Exploitation des résultats de PCR quantitative

### Quantification par le SYBR Green :

La quantification de l'ADN se fait par la méthode du SYBR Green. Il s'agit d'un agent intercalant fluorescent capable de se lier à l'ADN double brin uniquement. Au cours de la PCR, lorsque le SYBR Green se fixe sur l'ADN double brin naissant, il y a émission de fluorescence. Celle-ci va être mesurée à la fin de chaque cycle de PCR, après l'étape d'élongation.

### Correction de l'efficacité de PCR :



**Figure 1 : Exemples de courbes d'amplification obtenues par Q-PCR**

Les courbes d'amplification présentent trois phases (Figure 1) : une phase de latence, une phase exponentielle et une phase de plateau. La phase de latence dure jusqu'à ce que le signal de fluorescence émis par le produit PCR dépasse une valeur seuil qui correspond au bruit de fond. Le nombre de cycle d'amplification nécessaire pour obtenir un signal fluorescent statistiquement significatif par rapport au bruit de fond (valeur seuil) est appelé le « Crossing point » (Cp). Puis vient la phase exponentielle qui se termine lorsque l'efficacité de la PCR chute. La réaction entre alors dans une phase de plateau.

Lors de la phase exponentielle, une réaction d'amplification parfaite où l'efficacité est de 2 (c'est-à-dire que chaque produit PCR est répliqué une fois dans chaque cycle) peut être décrite par l'équation suivante :

$$T_n = T_0 \times 2^n$$

Cependant les expériences de PCR sont influencées par de nombreux facteurs qui font varier cette efficacité. Ainsi, l'amplification PCR sera plutôt décrite comme :

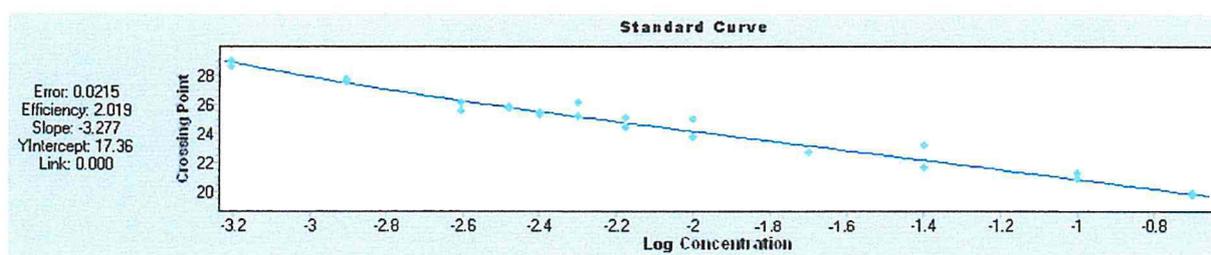
$$T_n = T_0 \times E^n$$

Où  $T_n$  correspond au nombre de molécules cibles au cycle  $n$ ,  $T_0$  au nombre initial de molécules cibles et  $E$  à l'efficacité de l'amplification.

Pour calculer cette efficacité, il est nécessaire de définir une courbe standard pour chaque gène étudié (gènes cibles et gène de référence). Une gamme de dilutions est ainsi réalisée à partir de mix d'ADNc issus de plants traités/non traités. Les courbes standard permettent de déterminer la concentration des échantillons. A partir de ces courbes, une droite de régression peut être réalisée (Figure 2). L'efficacité de PCR est alors calculée grâce à la formule suivante :

$$E = 10^{\frac{-1}{\text{pente}}}$$

Elle doit être comprise entre 1,7 et 2, ainsi que l'erreur standard qui doit être inférieure à 0,15.



**Figure 2 : Droite de régression permettant de calculer l'efficacité de PCR**

#### Calcul du ratio normalisé :

Une fois les courbes standards de chaque gène enregistrées, la quantification relative peut être réalisée. Pour chaque analyse, la courbe standard correspondant au gène étudié doit être appelée grâce au logiciel, afin de corriger l'efficacité de PCR et de permettre les calculs de concentrations. En plus des échantillons, des dilutions des plasmides du gène étudié et du gène de référence sont analysées. Celles donnant un Cp de 25 cycles définissent les calibrateurs. Ils vont permettre de normaliser la réaction et de comparer des niveaux d'expression entre traitements positionnés sur plusieurs plaques.

Le ratio utilisé pour l'analyse statistique des résultats est calculé de la manière suivante :

$$\text{Normalized Ratio} = \left( \frac{\text{conc. target}}{\text{conc. reference}} \right)_{\text{sample}} : \left( \frac{\text{conc. target}}{\text{conc. reference}} \right)_{\text{calibrator}}$$

## Annexe 6 : Alignement pour la vérification de la séquence du plasmide BTF3b

	1                    10                    20                    30
CL13Contig1 BTF3b-like transcription factor	CTCGCTGTGTGTTTCCATCGGCTCGCTCTCATTTTTCAT
CL13Contig1BTF3b-like transcription factor - plasmid	-----
Consensus	-----
	40                    50                    60                    70
CL13Contig1 BTF3b-like transcription factor	TTCACCCCCTACCTTCCGTTCCCTGCAGCCTACCCACCTGT
CL13Contig1BTF3b-like transcription factor - plasmid	-----ACCCACCTGT
Consensus	-----
	80                    90                    100                    110
CL13Contig1 BTF3b-like transcription factor	CCTCTGTAAAGATTGCATAGGCGCACACCCATTGAGTAGG
CL13Contig1BTF3b-like transcription factor - plasmid	CCTCTGTAAAGATTGCATAG-----
Consensus	-----
	120                    130                    140                    150
CL13Contig1 BTF3b-like transcription factor	GCACACCCCATTGAGTAAACATCGTTGTCGAGTCCCGGC
CL13Contig1BTF3b-like transcription factor - plasmid	-----
Consensus	-----
	160                    170                    180                    190
CL13Contig1 BTF3b-like transcription factor	ATTAGTCCAAAAAGCTGGGAACCTTTTCCCAGGAAGTTAT
CL13Contig1BTF3b-like transcription factor - plasmid	-----AT
Consensus	-----AT
	200                    210                    220                    230
CL13Contig1 BTF3b-like transcription factor	GAATAGGGAGAAGCTTATGAAAGATGGCTGGTGCAGTTCGC
CL13Contig1BTF3b-like transcription factor - plasmid	GAATAGGGAGAAGCTTATGAAAGATGGCTGGTGCAGTTCGC
Consensus	GAATAGGGAGAAGCTTATGAAAGATGGCTGGTGCAGTTCGC
	240                    250                    260                    27
CL13Contig1 BTF3b-like transcription factor	ACTGGTGGGAAGGGCAGCATGAGAAGAAAGAAGAGGCT
CL13Contig1BTF3b-like transcription factor - plasmid	ACTGGTGGGAAGGGCAGCATGAGAAGA-----
Consensus	ACTGGTGGGAAGGGCAGCATGAGAAGA

## RESUME

Afin d'augmenter la production de latex chez *Hevea brasiliensis*, l'éthéphon, un générateur d'éthylène, est aujourd'hui utilisé à l'échelle industrielle comme agent stimulant. Ce traitement a pour effet d'augmenter la durée d'écoulement du latex et d'améliorer sa régénération. L'éthylène semble donc coordonner un ensemble de voies métaboliques étudiées par une approche transcriptomique.

Dans de précédentes études, des banques SSH (Hybridation suppressive et soustractive) ont donc été réalisées afin d'isoler les gènes de réponse à l'éthylène. Puis l'expression de ces gènes a été analysée par *Reverse Northern* sous l'impact de différents stress abiotiques (éthylène et blessure) chez trois clones à métabolisme contrasté (PB217, RRIM600 et PB260).

La présente étude peut se diviser en deux parties. Dans un premier temps, l'objectif est de valider par RT-PCR quantitative l'expression de 3 gènes mis en évidence par *Reverse Northern* comme discriminant les trois clones à métabolisme contrasté. Les 3 gènes choisis sont *HbPIP-like*, *HbHSP70* et *HbACSF2*. Dans un deuxième temps, il s'agit d'étudier l'expression, toujours par RT-PCR quantitative, de 4 facteurs de transcription susceptibles de jouer un rôle dans la régulation de gènes de réponse à l'éthylène. Ces facteurs de transcription avaient été mis en évidence dans les banques SSH. L'expression de chaque gène a été étudiée en cinétique chez de jeunes plants greffés des clones PB217, RRIM600 et PB260, en réponse à la blessure et à l'éthylène.

Les résultats montrent que les gènes *HbPIP-like* et *HSP70* pourraient permettre de discriminer les trois clones sous certaines conditions de stress. Les facteurs de transcription étudiés présentent également des variations significatives de leur expression sous l'impact des différents traitements.

## ABSTRACT

In order to increase the production of *Hevea brasiliensis* latex, an ethylene generator called ethephon is commonly used in industrial plantations as a stimulating agent. This treatment increases latex flow duration and improves its regeneration. Ethylene seems to coordinate metabolic pathways which are studied by a transcriptomic approach.

In previous studies, Suppressive and Subtractive Hybridization (SSH) libraries have been carried out to isolate ethylene-response genes. Then the expression of these genes has been analyzed by Reverse Northern under various abiotic stresses (ethylene and wounding) in three clones with contrasted metabolism (PB217, RRIM600 and PB260).

This study can be divided in two parts. In the first part, the objective is to validate by quantitative RT-PCR the expression of 3 genes, identified through Reverse Northern, which could discriminate clones with contrasted metabolism. The chosen genes are *HbPIP-like*, *HSP70* and *ACSF2*. In a second part, 4 transcription factors have been analyzed by quantitative RT-PCR as well. These transcription factors previously isolated in the SSH libraries were supposed to play a role in the regulation of ethylene-response genes. The expression of each gene has been studied in kinetics in young budded plants from PB217, RRIM600 and PB260 clones upon wounding and ethylene treatment.

Genes *HbPIP-like* and *HSP70* showed specific pattern of expression upon stresses which could be used to discriminate the metabolism of the three studied clones. The transcription factors show significant variations of their expression under the different treatments.