



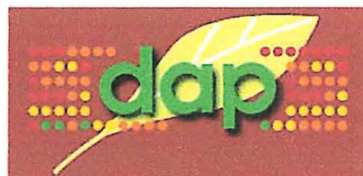
**Université Montpellier II**  
**SCIENCE ET TECHNIQUE DU LANGUEDOC**  
**Master Biologie, Géoscience, Agronomie, et Environnement**  
**Spécialité : Biologie et Evolution des Plantes**

Année Universitaire 2008-2009

**ETUDE DE LA REGULATION SPATIALE DE  
L'EXPRESSION DES GENES INTERVENANT  
DANS LA BIOSYNTHESE DE L'ETHYLENE ET  
DANS LES SYSTEMES DE DETOXICATION DES  
ESPECES ACTIVEES DE L'OXYGENE CHEZ  
HEVEA BRASILIENSIS**

**Riza-Arief PUTRANTO**  
**Responsable de stage : Pascal Montoro**

Mots clés	: hévéa, éthylène, biosynthèse, système antioxydant
Nombre de mots du résumé	: 250 mots
Nombre de mots du manuscrit	: 7057 mots



Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement  
UMR Développement et Amélioration des Plantes (DAP)

Equipe Biologie Cellulaire de la Réponse aux Stress abiotiques et biotiques chez les espèces  
pérennes Tropicales (BURST)

CIRAD-DIST  
Unité bibliothèque  
Lavalette





## RESUME

L'hévéa est l'arbre le plus haut producteur de caoutchouc naturel qui est un hydrocarbure de type polyisoprène à haut poids moléculaire présent dans le latex. Dans la plantation, la production de latex par la saignée est stimulée par l'application d'éthéphon. Cet éthylène exogène provoque la biosynthèse d'éthylène endogène. La saignée, la stimulation ainsi que les stress environnementaux déclenche la production de radicaux libres. Ainsi, l'activation des systèmes de détoxification des espèces activées de l'oxygène est importante pour la stabilité de la production de latex.

La régulation de l'expression de gènes intervenant dans la biosynthèse de l'éthylène et les systèmes antioxydants ont été étudiées dans les racines en réponse à la blessure, l'éthylène exogène et le stress hydrique afin d'avoir une meilleure compréhension des processus développementaux et des réponses aux stress. En effet, aucune information n'est disponible sur le fonctionnement moléculaire des racines chez l'hévéa.

Les gènes intervenant dans la biosynthèse de l'éthylène et les systèmes de détoxification des espèces activées de l'oxygène ont leur expression régulée différemment sur le plan spatio-temporel et en réponse aux stress abiotiques. Il y a une grande diversité d'accumulation de transcrits entre les trois organes étudiés (feuille, écorce et racine). Par exemple, les transcrits *SAMS* sont fortement accumulés dans l'écorce, ceux d'*ACO3* dans les feuilles. Pour les systèmes antioxydants, les transcrits *CAS* sont accumulés dans les écorces et les racines, ceux de *MnSOD* dans les feuilles, d'*APX1* dans tous les organes, et de *GCLchl* dans les racines.

Mots clés : hévéa, éthylène, biosynthèse, système antioxydant

22 MARS 2010





## REMERCIEMENTS

Je voudrais remercier avant tout l'Ambassade de France en Indonésie, et plus particulièrement le Service de la coopération scientifique et culturelle ainsi que le CROUS de Montpellier d'avoir soutenu financièrement mon étude en première année de Master.

Ce travail a été réalisé au sein de l'équipe *Biologie Cellulaire de la Réponse aux Stress chez les espèces Tropicales* (BURST) et dans le laboratoire de l'Unité mixte de recherche *Développement et Amélioration des Plantes* (UMR-DAP). Aussi, je tiens à remercier pour son accueil le directeur de l'UMR Monsieur Emmanuel Guiderdoni.

Le stage a été encadré par Pascal Montoro que je tiens à remercier pour son aide et sa disponibilité au cours de ce travail.

Je désire remercier sincèrement Julie Leclercq pour son aide et ses conseils.

Je m'adresse ensuite mes remerciements à Christine Sanier et Maryannick Rio pour son aide, son accompagnement pendant la durée de stage

J'adresse mes remerciements à Monsieur Gérald Oliver, ainsi que Mesdames, Florence Dessailly, Florence Martin, pour leur appui technique. Mes remerciements s'adressent également à Mme Florence Chazot pour ces aides précieuses lors des démarches administratives.

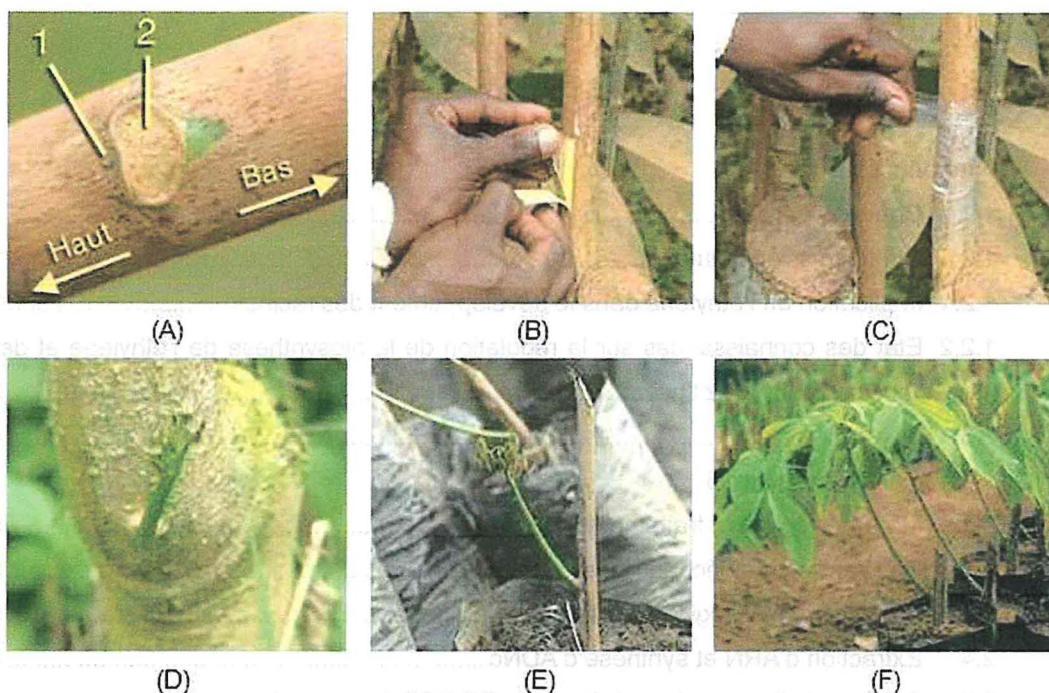
Je remercie ensuite Mademoiselle Cuifang Duan et Virginie Gébelin pour leur support pendant la durée de stage.

Et enfin, un grand merci à toute la communauté indonésienne à Montpellier, pour leur support, leur encouragement, et leur accueil amical.

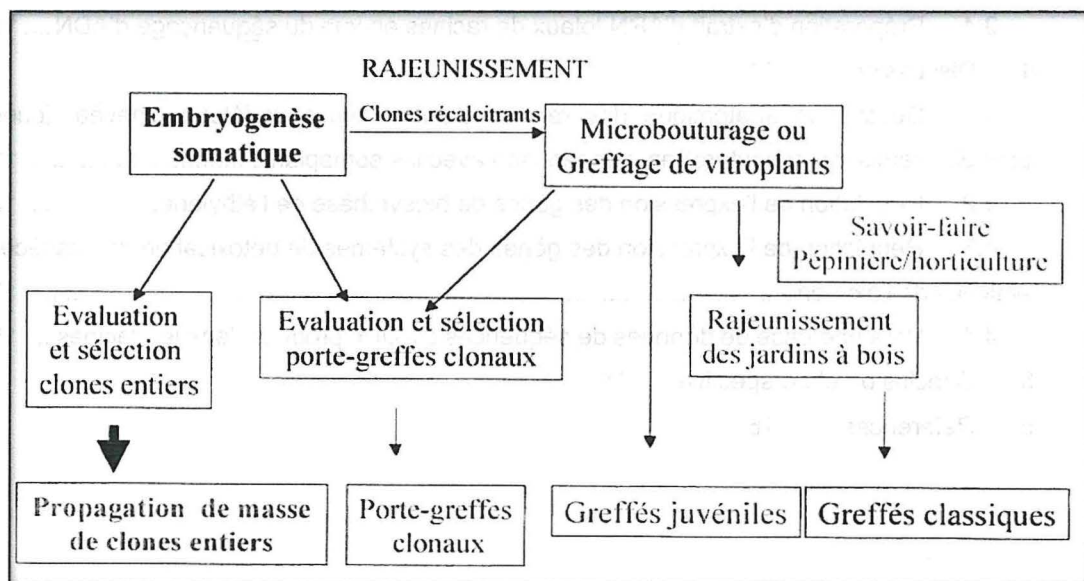


## TABLE DE MATIERES

1	Introduction	1
1.1	Contexte général.....	1
1.2	Contexte scientifique.....	2
1.2.1	Implication de l'éthylène dans le développement des racines.....	2
1.2.2	Etat des connaissances sur la régulation de la biosynthèse de l'éthylène et des systèmes antioxydants chez l'hévéa.....	3
1.3	Objectif du stage .....	4
2	Matériel et méthodes	5
2.1	Matériel végétal et traitements.....	5
2.2	Prélèvement des échantillons .....	5
2.3	Protocole d'histologie et analyse des images.....	5
2.4	Extraction d'ARN et synthèse d'ADNc.....	5
2.5	Analyse de l'expression génique par RT-PCR à temps réel.....	5
2.6	Préparation des ARN pour le séquençage des ADNc de racines .....	6
3	Résultats	6
3.1	Etude anatomique des racines des somaplants .....	6
3.2	Régulation de l'expression des gènes de biosynthèse d'éthylène .....	7
3.3	Régulation de l'expression des gènes des systèmes de détoxication des espèces activées de l'oxygène .....	9
3.4	Préparation d'extrait d'ARN totaux de racines en vue du séquençage d'ADN....	11
4	Discussion	11
4.1	Description anatomique des racines d'autres types variétaux d'hévéa (jeune plantule, semis, microbouture) en comparaison avec les somaplants .....	11
4.2	Régulation de l'expression des gènes de biosynthèse de l'éthylène.....	12
4.3	Régulation de l'expression des gènes des systèmes de détoxication des espèces activées de l'oxygène .....	13
4.4	Vers une base de données de séquences d'ADNc produits dans les racines ....	15
5	Conclusion et perspective	15
6	Références	16



**Figure 1.** Greffage de l'hévéa. (A) Le greffon ou "œil" est un bourgeon axillaire (1) bien visible sur la tige se trouvant au-dessus de chaque cicatrice (2) produite par la chute d'une feuille ; (B) le greffon glissé, œil vers le haut, cicatrice foliaire vers le bas, dans l'entrebâillement que l'écorce du porte-greffe fait avec son bois ; (C) un emmaillotage réalisé de bas en haut pour que les spires de la bandelette utilisée se recouvrent comme les tuiles d'un toit et protègent la greffe de la pluie ; (D) le démaillotage a eu lieu 15 jours (en vert) à trois semaines ; (E) le greffon croît et se développe sur le porte-greffe qui est alors étêté ; (F) les plants greffés et sevrés se développent en pépinière en sacs. Ils seront aisément transportables, tels quels vers la plantation (Vabors, 2008).



**Figure 2.** Schéma de fonction d'embryogenèse somatique et de microbouturage pour la propagation d'hévéa (Montoro, 2008)

## 1 INTRODUCTION

### 1.1 Contexte général

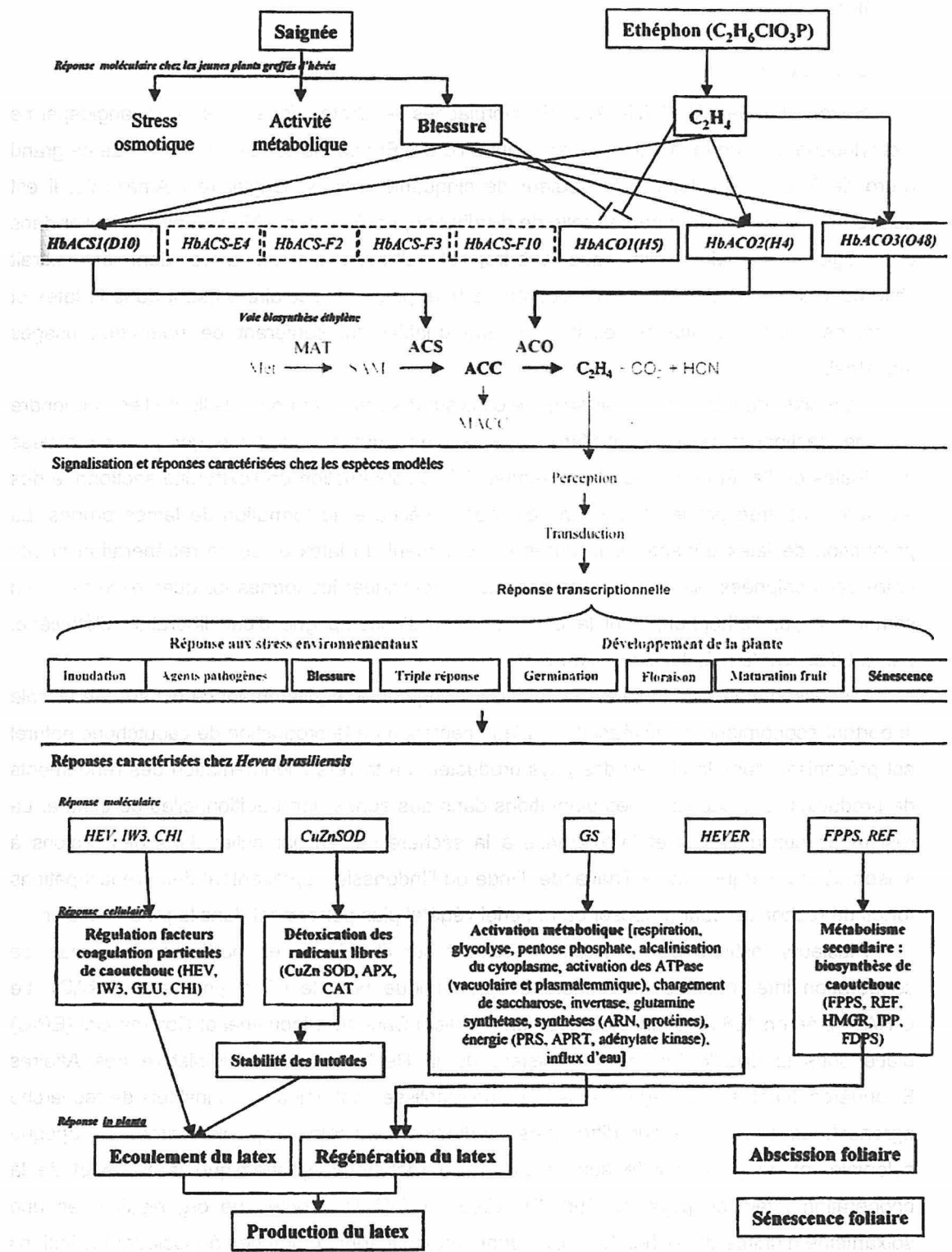
*Hevea brasiliensis* (Müll- Arg. Euphorbiacées – Crotonoïdées) est une angiosperme dicotylédone de type monoïque, appartenant à l'ordre Euphorbiales. La croissance de ce grand arbre de forêt peut atteindre la hauteur de cinquante mètres. Originaire d'Amazonie, il est cultivé en dehors de son aire naturelle de distribution, en Asie et en Afrique, en particulier dans des régions à régime climatique sub-tropical. L'hévéa est un arbre dont est extrait l'hydrocarbure « caoutchouc », polyisoprène à haut poids moléculaire présent dans le latex et caractérisé par des qualités élastiques remarquables lui conférant de nombreux usages industriels.

La récolte du latex se fait par saignée consistant à pratiquer une entaille de l'écorce tendre afin de sectionner le tissu laticifère à l'aide d'un couteau ou d'une gouge. Les causes principales de l'arrêt de l'écoulement semblent être l'obstruction de l'extrémité sectionnée des laticifères montrée par le phénomène d'encoche sèche et la formation de lames brunes. La production de latex dépend de la durée d'écoulement du latex et de sa régénération *in situ* entre deux saignées, ainsi que de sa capacité à détoxifier les formes toxiques d'oxygène. La stimulation par l'éthéphon, dont la décomposition s'accompagne d'une libération d'éthylène, permet d'activer le métabolisme interne.

La consommation mondiale en caoutchouc augmente régulièrement ce qui suscite un rôle important économique à l'hévéaculture. L'augmentation de la production de caoutchouc naturel est préconisée dans la plupart des pays producteurs à travers l'augmentation des rendements de production et l'extension des plantations dans des zones non traditionnelles de culture. La résistance aux maladies et la tolérance à la sécheresse, en particulier dans des régions à saison sèche marquée de la Thaïlande, l'Inde ou l'Indonésie, représentent des préoccupations fortes de recherche pour proposer du matériel végétal plus performant dans le proche avenir.

Plusieurs instituts de recherche travaillent sur l'hévéa et en particulier le Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement (CIRAD). Le CIRAD, créé en 1984, est un Etablissement Public à Caractère Industriel et Commercial (EPIC) placé sous la double tutelle du Ministère de la Recherche et du Ministère des Affaires Etrangères. Il est issu du regroupement, en un établissement unique, des instituts de recherche agronomique spécialisés sur différentes productions agricoles tropicales, créés à l'époque coloniale, et adaptés ensuite aux enjeux de la recherche agronomique tropicale et de la coopération avec les pays du Sud. En 2005, le CIRAD adopte une organisation en une soixantaine d'unités de recherches (UR) dont certaines sont communes à plusieurs institutions de recherche et de formation agronomique (Unité Mixte de Recherche : UMR).

Mon projet de recherche a été réalisé dans l'équipe Biologie Cellulaire de la Réponse aux Stress abiotiques et biotiques chez les espèces pérennes Tropicales (BURST) de l'UMR Développement et Amélioration des Plantes (DAP) qui est une des unités du Département



**Figure 3.** Modèle de travail présentant l'influence de la stimulation éthylénique et de la blessure sur la régulation de la biosynthèse d'éthylène et la réponse à l'éthylène au niveau moléculaire, cellulaire et *in planta* (écoulement et régénération du latex, abscission et sénescence foliaire) chez *Hevea brasiliensis* (Kuswanhadi, 2006).



BIOS du Cirad. Des travaux sur la micropropagation par embryogenèse somatique et par microbouturage permettent de disposer aujourd'hui de matériel clonal pour la recherche. La sélection et la production de clones de porte-greffe est un des axes de recherche menés en collaboration entre l'équipe Burst et mon institut d'origine, l'IBRIEC (*Indonesian Biotechnology Research Institute for Estate Crops*). Par ailleurs, l'équipe Burst conduit des études sur les bases moléculaires de différents variétaux d'hévéa à la réponse de la tolérance et du stress d'exploitation.

L'hévéa est allogame et fortement hétérozygote. Le clone d'hévéa est un clone aérien multiplié par greffage sur des porte-greffes issus de semis non sélectionnés (**Figure 1**). Cette sélection et multiplication végétative permet d'obtenir des clones plus performants dont les rendements de production de caoutchouc naturel ont progressivement augmentés par rapport aux semis sélectionnés. Les meilleurs clones produisent aujourd'hui jusqu'à 3500 kg caoutchouc/ha/an contre les 350-500 kg produits dans les plantations de semis (Ferrand, 1944).

Chez l'hévéa, il existe une difficulté voire impossibilité de multiplier des plants de franc-de-pied par bouturage ce qui a suscité la sélection des clones uniquement sur la partie aérienne. Cependant, dans les années 1980-1990, des chercheurs du CIRAD ont développé des techniques de micropropagation qui permettent de produire différents types variétaux à partir des plants franc-de-pied obtenus et rajeunis par embryogenèse somatique (**Figure 2**) (Montoro et al., 2008).

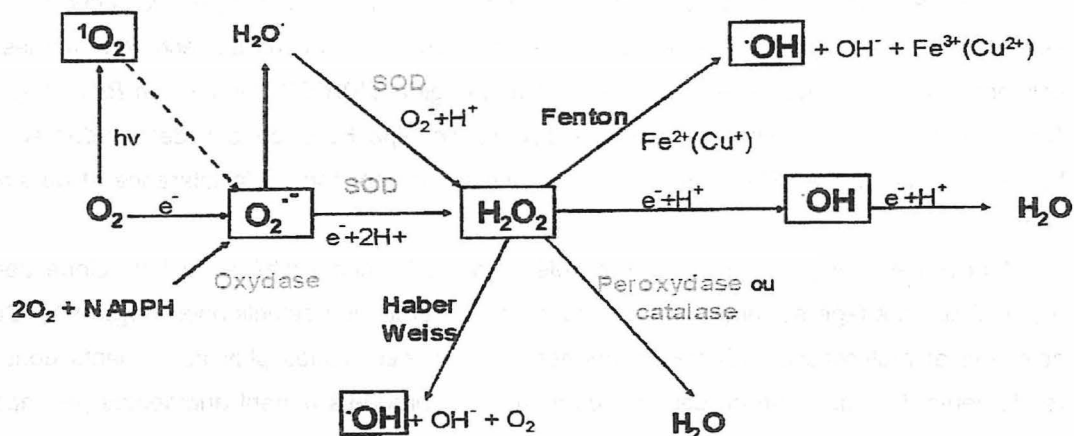
Le microbouturage de semis ouvrent notamment la voie à la sélection de clones de porte-greffe. Des critères de phénotypage seront nécessaires et utiles pour la sélection de ces nouveaux types variétaux. Une bonne connaissance fonctionnelle du système racinaire est donc nécessaire pour comprendre la variabilité intra-clonale, inter-clonale, et l'impact des méthodes de clonage.

## 1.2 Contexte scientifique

### 1.2.1 Implication de l'éthylène dans le développement des racines

L'éthylène est une hormone végétale qui intervient dans de nombreux aspects du développement tels que la germination des graines, la sénescence et l'abscission des feuilles et des fleurs, la croissance et le développement des racines, le développement et le mûrissement des fruits. L'hormone éthylène est aussi synthétisée en réponse aux stress, à la blessure, à l'infection par des agents pathogènes, à l'exposition à des métaux lourds et en réponse à la sécheresse. L'éthylène, un hydrocarbure insaturé de structure brute  $C_2H_4$ , est la seule hormone végétale présente sous forme de gaz. Elle est donc très volatile ce qui lui permet une diffusion rapide dans la plante mais aussi vers l'extérieur et donc sur les plantes avoisinantes.

Cette phytohormone simple contribue dans des effets divers au sein du développement racinaire, voire son implication avec d'autres hormones végétales. Chez *Arabidopsis*, elle inhibe



**Figure 4.** Voie de synthèse des espèces réactives en oxygènes (ROS).

$^1O_2$  : singulet d'oxygène,  $O_2^{\bullet -}$  : anion superoxyde,  $H_2O_2$  : peroxyde d'hydrogène,  $\bullet OH$  : radical hydroxyl, SOD : superoxyde dismutase (Scandalios, 2005).

**Tableau 1.** Exemples de dommages causés par les ROS (Scandalios, 2005).

<b>Oxydations des lipides</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Désorganisation membranaire et mort cellulaire suite à des modifications des acides gras de la bicouche lipidique</li> <li>• Dans la nourriture, rancissement et développement des mauvaises odeurs</li> </ul>
<b>Oxydations des protéines</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Modifications d'acides aminés sensibles aux ROS</li> <li>• Fragmentation de la chaîne peptidique</li> <li>• Charge électrique altérée</li> <li>• Sensibilité accrue à la protéolyse</li> <li>• Destruction de la fonction enzymatique par oxydation des hèmes ferriques par <math>O_2^{\bullet -}</math></li> </ul>
<b>Oxydations de l'ADN</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Délétions, mutation, translocations</li> <li>• Dégradation des bases, rupture des brins, liaison entre l'ADN et des protéines</li> </ul>



l'élongation racinaire et provoque l'expansion radicale des racines (Cervantes and Tocino, 2005). Des réponses rapides à l'éthylène ont ainsi été démontrées dans l'induction de poils absorbants (Masucci and Schiefelbein, 1996), (Tanimoto et al., 1995) en relation avec la disponibilité de phosphore sous sol (Borch et al., 1999), (Zhang et al., 2003). Ensuite, l'éthylène incite aussi le développement de poils absorbants en induisant de façon indirecte l'auxine (Kulka, 2008), (Rahman et al., 2002) et l'acide jasmonique (Zhu et al., 2006) dans les racines. Le blocage de l'éthylène provoque un arrêt de développement racinaire marqué par un blocage d'effet de l'acide jasmonique (Zhu et al., 2006). De plus, la production de l'éthylène endogène a été accrue dans l'interaction plant-pathogène (Giazar et al., 1983) ainsi que dans le changement de type de nodules chez *Sesbania rostrata* (Fernando-Lopez et al., 1998). L'éthylène inhibe la nodulation dans le système racinaire, bloque la division des cellules corticales et réduit le nombre des infections corticales.

#### 1.2.2 Etat des connaissances sur la régulation de la biosynthèse de l'éthylène et des systèmes antioxydants chez l'hévéa

Chez l'hévéa, la production de latex est stimulée par l'application d'éthéphon qui agit sur la prolongation de l'écoulement et la régénération du latex entre deux saignées (d'Auzac, 1989a). L'application d'éthéphon ou d'éthylène gaz active la voie de biosynthèse d'éthylène endogène et stimule la production du caoutchouc naturel (Kuswanhadi, 2006) (**Figure 3**). La biosynthèse de l'éthylène étant catalysée par l'ACC synthase et l'ACC oxydase se fait en trois étapes. A l'origine de la voie de biosynthèse, la production de S-adenosyl méthionine (SAM) est catalysée par le SAM synthétase ou la méthionine adénosyltransférase à partir de la méthionine et d'un ATP. Ensuite, l'ACC synthase convertit le SAM en acide aminocyclopropane-1-carboxylique (ACC) (Kende, 1993). Lors de l'étape finale, la conversion de l'ACC en éthylène est réalisée par l'ACC oxydase (Yang and Hoffman, 1984). La méthylthioadénine (MTA) est recyclée en méthionine via le cycle de Yang (Capitani et al., 2005).

Trois séquences d'ADNc en pleine longueur de gènes *HbACO1*, *HbACO2*, et *HbACO3*, et une séquence d'*HbACS1* en pleine longueur codant l'ACC synthase ont été isolées (Kuswanhadi, 2006). L'éthylène exogène provoque l'accumulation des transcrits de ces gènes qui engendrent la production d'éthylène endogène après stimulation. L'éthylène est bien connu pour activer l'action du jasmonate dans le cas de la réponse à la blessure (O'Donnell et al., 1996). Inversement, le rôle de la blessure sur la biosynthèse de l'éthylène est bien décrit (Kende, 1993). La blessure provoque une induction de l'ACS et de l'ACO avec une réponse rapide (<15 min.) et fugace de l'expression des gènes *HbACS* et *HbACO* au niveau de l'écorce et de la feuille. La réponse éthylénique intervient avec un décalage de plusieurs heures (4-8h) après le traitement (Kuswanhadi, 2006).

Les espèces réactives de l'oxygène (EAO), fabriquées de la réduction incomplète des molécules hautement réactives produisant ensuite des radicaux libres comme le radical superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ), le radical perhydroxyle ( $HO_2^{\cdot}$ ), le radical hydroxyle ( $\cdot OH$ ), le radical

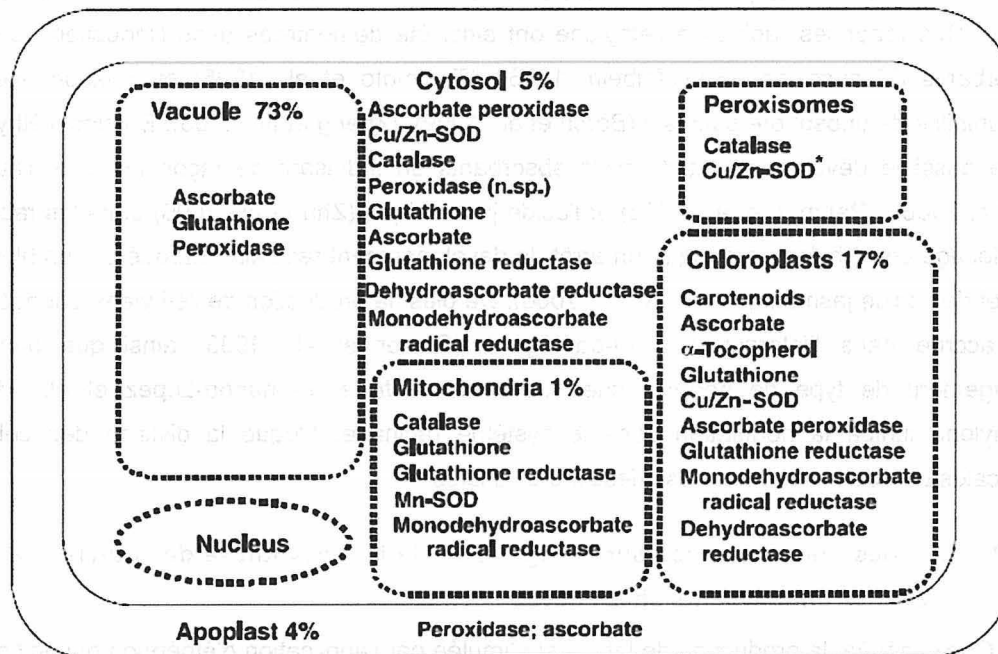


Figure 5. Localisation et proportion des systèmes de détoxification dans la cellule (Gébelin, 2006).

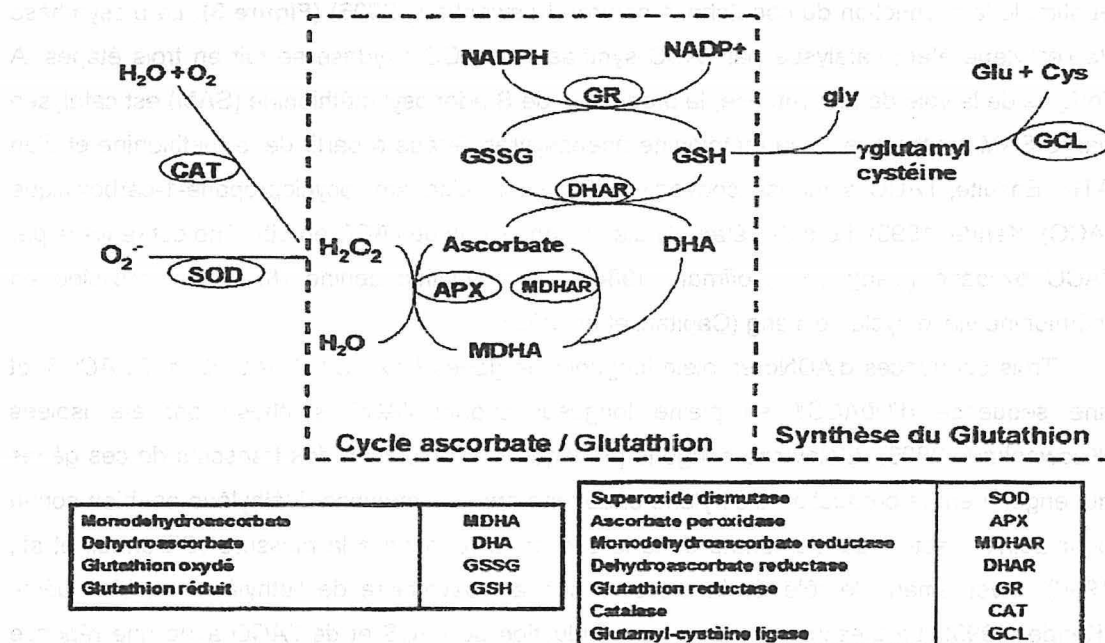


Figure 6. Liste des enzymes impliqués dans le cycle ascorbate/glutathion et dans la biosynthèse du glutathion (Gébelin, 2006).

peroxyde ( $RO_2^\bullet$ ), le radical alkoxy ( $RO^\bullet$ ), ainsi que des formes non radicales comme le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) ; sont depuis longtemps reconnues pour leur importance dans la réponse des plantes aux contraintes environnementales (**Figure 4**). Même si les EAO sont formées au cours du métabolisme normal de la plante, l'augmentation de leur concentration intracellulaire est souvent synonyme de stress (burst oxydatif). La plupart des symptômes liés aux conditions de stress (hydrique, éthylène) est amplifiée par l'effet d'EAO (Willekens et al., 1997). Pourtant, l'augmentation de leur concentration, pendant ces stress, entraîne de nombreux dommages à la cellule tels que des peroxydations de composés des membranes, la dégradation de polysaccharides, la dénaturation des enzymes et des lésions dans l'ADN (**Tableau 1**) (Scandalios, 2005).

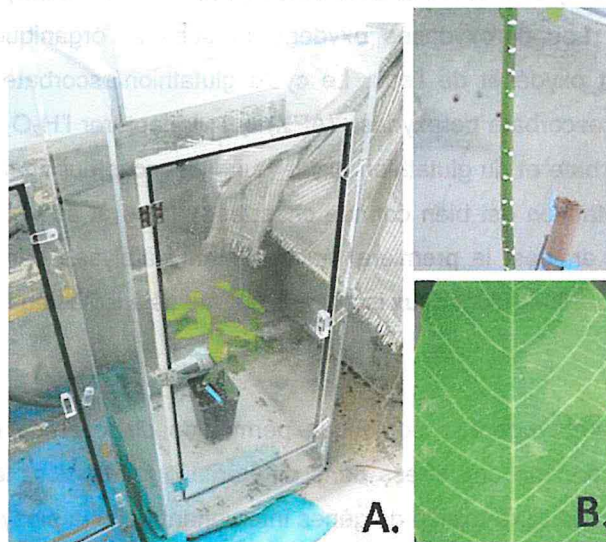
Lors du stress abiotique, l'EAO sont produites chez l'hévéa qui entraîne un système de détoxification très efficace (**Figure 5**) qui peut être divisé en trois groupes : le groupe des enzymes antioxydantes, les antioxydants liposolubles associés aux membranes ( $\alpha$ -tocophérol,  $\beta$ -carotènes et l'ubiquinone) et enfin les antioxydants solubles dans l'eau (le glutathion et ascorbate) (Mittler, 2002 ; Scandalios, 2005). Les enzymes antioxydantes font partie d'un système de protection efficace et très actif (**Figure 6**). Ces enzymes incluent la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), les peroxydases et les enzymes du cycle glutathion/ascorbate. La SOD catalyse la dismutation de deux anions superoxydes et entraîne la formation de  $H_2O_2$  et d' $O_2$ . Il existe plusieurs isoenzymes différentes, par leur localisation et leurs métaux catalytiques, la MnSOD dans les mitochondries, la FeSOD dans les chloroplastes et la CuZnSOD dans le cytosol et les chloroplastes (Alscher et al., 2002). La CAT dégrade le  $H_2O_2$  en  $H_2O$  et  $O_2$ . Les peroxydases oxydent un substrat organique ( $RH_2$ ) avec  $H_2O_2$  produisant un substrat oxydé et de l'eau. Le cycle glutathion/ascorbate comporte plusieurs enzymes notamment l'ascorbate peroxydase (APX) qui va capturer l' $H_2O_2$ . Ce cycle permet la régénération de l'ascorbate et du glutathion oxydé qui est l'accepteur final. Par ailleurs, la voie de biosynthèse du glutathion est bien connue chez les plantes et se fait en deux étapes par l'ajout de trois acides aminés, la première réaction étant catalysée par la glutamyl-cystéine ligase (GCL) (Jez et al., 2004), dont deux isoformes ont été déjà isolés au laboratoire.

### 1.3 Objectif du stage

La maîtrise de l'embryogenèse somatique permet de disposer de matériel clonal pour l'étude des voies de réponse aux stress dans différents organes dont le système racinaire. L'étude de la régulation de l'expression de gènes intervenant dans la biosynthèse de l'éthylène et la détoxification des espèces activées de l'oxygène dans les racines par la blessure, l'éthylène exogène et le stress hydrique permettrait une meilleure compréhension des processus développementaux et de réponse aux stress. En effet, aucune information n'est disponible sur le fonctionnement moléculaire des racines chez l'hévéa.

**Tableau 2.** Récapitulatif des traitements (T) faits en serre de vitroplants de 1 an.

Traitements	T	Effectifs	Description
<b>Contrôle à 12h00</b>	1	2	Les plants n'ayant rien traité servent comme témoin pour les prélèvements de plants blessés (T2)
<b>Blessure 4h</b>	2	3	Les plants subissent des blessures sur les feuilles, par des pressions tous les 2 cm avec une pince crantée et sur l'écorce, par des entailles faites au scalpel espacées de 1 cm chacune, sur la tige au greffon. Le traitement « blessure 4h » est effectué à 8h00 du matin et le prélèvement à 12h00.
<b>Contrôle à 16h00</b>	3	1	Les plants n'ayant rien traités servent comme témoin pour les prélèvements de plants traités en éthylène (T4).
<b>Ethylène 1 ppm 8h</b>	4	3	Le plant est placé dans un caisson hermétique de 300 litres la porte ouverte ( <b>Figure 7</b> ) 24 heures avant le traitement pour limiter les effets liés au transport et aux blessures éventuelles. Le caisson est ensuite fermé et le gaz est injecté pour obtenir une concentration d'éthylène de 1 ppm (300 $\mu$ l d'éthylène pur) dans le caisson. Le traitement « éthylène 8h » est effectué à 8h00 du matin et le prélèvement à 16h00.
<b>Stress hydrique</b>	5	3	Les plants sont déposés dans un endroit sec (30°C) sans arrosage. Au bout de trois semaines, les prélèvements sont réalisés.



**Figure 7.** Caisson étanche utilisé pour l'application des traitements gazeux d'éthylène (A) ; le pincement des feuilles et l'entaille de scalpel au niveau de l'écorce pour le traitement de la blessure chez les somaplants (B).



## 2 MATERIEL ET METHODES

### 2.1 Matériel végétal et traitements

Des vitroplants du clone PB 260 ont été produits par embryogenèse somatique à partir de la lignée FM3. Après une acclimatation d'un mois depuis le 14 mars 2008, ces plants ont été élevés en pot de 1000 ml pendant 1 an en serre. Ensuite, les vitroplants ont été cultivés dans des conditions contrôlées en serre sous température de 28-30°C, l'humidité de 80%, trois fois d'arrosage chaque semaine (lundi, mercredi, vendredi), avec le traitement d'engrais (fumures minérales retard type « osmocote » diffusion lente). Les plants ont ensuite été traités par la blessure pendant 4 heures, par l'éthylène gaz (1 ppm) pendant 8 heures, ou par un « stress hydrique » sans arrosage pendant 3 semaines jusqu'au flétrissement des feuilles (**Tableau 2**).

### 2.2 Prélèvement des échantillons

Des échantillons de feuilles, d'écorce et de racines ont été prélevés sur des vitroplants du clone PB 260. Pour les racines, différents types ont été collectés : les racines moyennes d'un diamètre supérieur à 2 mm, les racines fines différenciées entre 1 à 2 mm de diamètre et leur apex, et les racines extra-fines différenciées de moins de 1 mm de diamètre et leur apex (Jourdan, comm. pers, CIRAD) (**Annexe 1**).

### 2.3 Protocole d'histologie et analyse des images

Une méthode classique de Martoja et Martoja-Pierson (1967) est appliquée pour la fixation des tissus de différentes parties de la racine (**Annexe 2**). La coloration avec l'acide périodique de Schiff (APS) met en évidence les polysaccharides (paroi et amidon) par une coloration rouge (Martoja and Martoja-Pierson, 1967), tandis que le Naphtol Blue Black (NBB) colore les protéines en bleu-noir (Fisher, 1968). L'estimation de la surface du cylindre central et de la totalité de la racine est réalisée à l'aide du logiciel d'analyse d'image (ImageJ).

### 2.4 Extraction d'ARN et synthèse d'ADNc

L'ARN est extrait par une méthode sur coussin de césium à partir de 1 g d'échantillon (**Annexe 3**). Les extraits d'ARN totaux sont dosés et leur contamination par de l'ADN génomique est évalué par une amplification par PCR du gène de l'actine (**Annexe 5**). Les ADNc sont synthétisés à partir 2 µg d'ARN totaux des différents tissus étudiés. La rétro-transcription est réalisé avec le Kit RevertAid™ M-MuIV Reverse Transcriptase (Fermentas) utilisant un poly-T ancré de type Oligo (dT)<sub>12</sub>VN (**Annexe 4**).

### 2.5 Analyse de l'expression génique par RT-PCR à temps réel

L'expression de 16 gènes, dont 8 sont impliqués dans la biosynthèse d'éthylène, et 8 sont impliqués dans la détoxification des espèces activées de l'oxygène, a été réalisée en plaque 96 puits sur le LightCycler 380 (Roche, Californie, USA) (**Tableau 3**). Les conditions de PCR sont :

**Tableau 3.** Liste des amorces permettant l'amplification par PCR et des produits attendus pour les gènes de référence, de biosynthèse de l'éthylène et de détoxification des espèces activées de l'oxygène.

GENE	NOM	STOCK	SEQUENCE (5' à 3')	TAILLE (pb)
<b>Actine</b>	Actine	D/2	AGTGTGATGTGGATATCAGG	195
		D/3	GGGATGCAAGGATAGATC	
<b>GET1</b>	SAM	B/56	CACCAATGGCATAGGAGAC	244
		B/57	ACCTTAACCCGTCAGGGC	
<b>GET2</b>	ACS1	B/63	GATCAATGATGGAAGAGACC	180
		B/64	CCAAACGGGTTGATCTGT	
<b>GET3</b>	ACSF3	B/39	TCCTCACTCTCCGCTTGT	190
		B/40	CTTGCTAGTTGCTACGCATA	
<b>GET4</b>	ACSF10	B/41	CAAGCCAGAAATTGAGCATG	180
		B/42	CGTGTCTCTTTAGTTGC	
<b>GET5</b>	ACO1	B/84	TGCAGGCCTCAAGTTCCAA	157
		B/46	CTTCATCATCAATAGCGGCT	
<b>GET6</b>	ACO2	B/61	CAGCACCAGCTTTGG	223
		B/62	ACACTCCCAAATATTCCTCTC	
<b>GET7</b>	ACO3	B/27	CAGAAGAAGCTGGTGTAC	198
		B/28	CAACTCTCAATCCTCTCT	
<b>GET8</b>	CAS	B/31	TAAGTGCTTTGGGATGGG	183
		B/32	GGGTGAAGTGAGAATTGATG	
<b>GSO1</b>	CuZnSOD	A91	AGACACAACAAATGGCTGC	400
		A92	TGAGTGAAGGTCTTGTAAC	
<b>GSO2</b>	MnSOD	B47	CTTGACAAAAGAATTGAAGAAGC	202
		B48	ATACACTTCACTTGATACTTCC	
<b>GSO3</b>	Catalase	B52	TATAGATCCTGGGCACCTG	190
		B53	GGTGGCATCATCTTCAAATG	
<b>GSO4</b>	GCL Cytoplasmique	B54	CAAGGAAATTGGGTTCTTG	202
		B55	TCCAAAAATTCAATGCAG	
<b>GSO5</b>	GCL chloroplastique	C82	ACTCCTGAAGAAACACAAATGCTG	294
		C83	GCCTCAGCAATCTAATTCACCTTAATAG	
<b>GSO6</b>	APX1	B58	TTACCGATCCTGTCTTCC	218
		B59	CCATCAACAACCAAACCAC	
<b>GSO7</b>	APX2	B58	TTACCGATCCTGTCTTCC	222
		B60	ATCAACCAACCCACTGCC	
<b>GSO8</b>	MDHAR	C84	AGCCCAGAAAAATATGGTGGC	113
		C85	TTCAGTTTGCCAGAATCTATCCAG	

la dénaturation à 95°C pendant 5 minutes, l'amplification à température d'hybridation de 60°C pendant 45 cycles, la courbe de fusion à 65°C pendant 60 secondes, le refroidissement à 40°C pendant 30 secondes (**Annexe 5**). Les données d'expression sont les chiffres normalisés obtenus par le logiciel LightCycler® 480 SW 1.5. Les données de trois répétitions biologiques issus des traitements et leurs contrôles spécifiques ont ensuite été traitées sur un tableau Excel pour calculer les moyennes et les écart-types pour chaque traitement, et les rapports traitement/contrôle et les p-Value des données deux-à-deux (traitement / contrôle) calculées grâce au test de Student.

## 2.6 Préparation des ARN pour le séquençage des ADNc de racines

Les ARN totaux de racines moyennes, fines et extra-fines de somaplants non traités âgés de 1 mois, 1 an et 3 ans, et de somaplants de 1 an traités par la blessure, l'éthylène et le stress hydrique ont été extraits sur coussin de césium. Après quantification et vérification de l'absence de contamination avec de l'ADN génomique, 2 µg de chaque échantillon ont été mélangés et envoyés à la société GATC en Allemagne pour séquençage sur une plateforme GS FLX (Roche / 454) avec le kit de séquençage Titanium run.

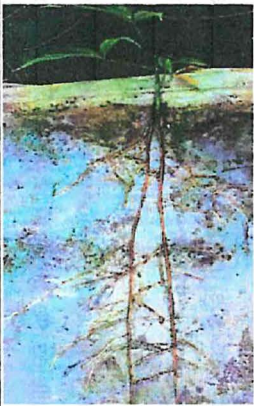
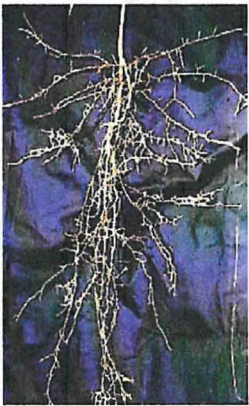

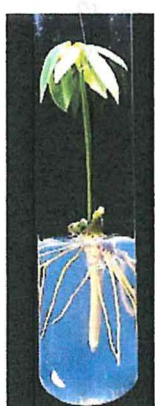

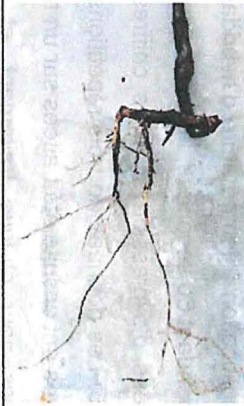
## 3 RESULTATS

### 3.1 Etude anatomique des racines des somaplants

Ne disposant pas d'information sur la structure des racines de somaplants, nous avons conduit une étude anatomique des différents types de racines afin de caractériser les échantillons analysés au niveau de l'expression génique. Le profil morphologique des racines de différents types variétaux issus de différents de jeune âge montre les différents systèmes racinaires entre eux par rapport à leur stade de développement (**Tableau 4**).

Chez les somaplants de 1 an, on observe deux types de structures au niveau du développement racinaire. On trouve une structure primaire chez les racines fines et extra-fines tandis que les racines moyennes présentent une structure secondaire (**Planche 1, Figure A1 - C2**). Quand les racines sont au stade de structure primaire, on observe des pôles de xylème et de phloème en position alterne donnant une structure en étoile. Les couches d'endoderme et de péricycle facilement distinguables sont deux assises unicellulaires formant deux anneaux délimitant le cylindre central (**Planche 1, Figure B2 et C2**). A ce stade, le cambium secondaire n'est pas en place. La structure secondaire des racines correspond à une croissance en épaisseur. Le cambium est formé à partir des cellules parenchymateuses situées entre les pôles de phloème et xylème primaires. Ces cellules se divisent et s'associent pour donner le cambium secondaire. La forme étoilée devient circulaire. Il donne vers l'extérieur des cellules qui se différencient en phloème secondaire et vers l'intérieur des cellules qui se différencient en xylème secondaire.

**Tableau 4.** Profil morphologique des racines de différents types variétaux âgés de 1 à 4 ans issus de microbouturage et d'embryogenèse somatique.

Types variétaux	Microbouture de semis	Microbouture	Semis	Jeune plantule	Somaplant	Somaplant
Morphologie						
Site de culture	Serre	Champ	Serre	In vitro	Serre	Serre
Age (mois)	6	12	6	3	12	48
Méthodes de propagation	Microbouturage	Microbouturage	Graines	Embryogenèse somatique	Embryogenèse somatique	Embryogenèse somatique
Nb de pivot	2	1	1	1	1	2
Références	Le Roux (1994)	Le Roux (1994)	Le Roux (1994)	Carron (2000)	Cette étude	Cette étude



En coupe transversale et longitudinale, la tige et le collet sont constitués de cellules bien développées à la structure secondaire (**Planche 1, Figure D1 et E1**). Du centre vers l'extérieur des différents tissus, on observe le xylème secondaire, le cambium, la zone du phloème secondaire, le sclérenchyme et la zone corticale (**Planche 1, Figure D2**). Dans la zone de phloème, on observe des cellules qui forment des anastomoses par hydrolyse de leurs parois communes. Ces cellules, qui synthétisent des particules de caoutchouc dans leur cytoplasme, sont les laticifères (**Planche 1, Figure D2 ; Planche 2, Figure B1**).

D'ailleurs, malgré son importance à la partie aérienne et racinaire, la réserve d'amidon est bien observée chez la racine moyenne (**Planche 1, Figure A1 et A2**), ainsi chez la tige et le collet (**Planche 1, Figure D1 - E2**). On remarque plus de présence d'amidon dans la racine moyenne que dans la racine fine et extra-fine (**Tableau 5**).

Même si on n'a pas de valeurs statistiquement significatives, on démontre qu'il existe une variation de la valeur de surface totale, de surface de cylindre central, et ainsi qu'il existe une relation en pourcentage entre les effectifs de différents types racinaires (**Tableau 5**). La valeur de surface totale est fortement conditionnée par la taille de racine. De même, le nombre de pôles ligneux primaires est plus élevé chez la racine fine comparée avec la racine extra-fine. On ne les trouve pas chez la racine moyenne puisqu'ils se sont développés en bois secondaire.

Différents types cellulaires sont observés :

- des cellules très actives, au contenu dense (rapport nucléo-cytoplasmique élevé), et même des cellules en division, au niveau de l'apex (**Planche 2, Figure A1 et A2**),
- des cellules laticifères au niveau du phloème primaire (**Planche 2, Figure B1 et B2**),
- des cellules riches en amyloplast de taille variée (**Planche 2, Figure C1**). Les grains d'amidon jouent un rôle important dans le géotropisme de la racine. Ils se déplacent selon l'apesantement, et sont alors appelés statolithes. On observe la position des statolithes dans différentes directions dans différentes parties de la coiffe vers le centre quiescent (**Planche 2, Figure C2**).

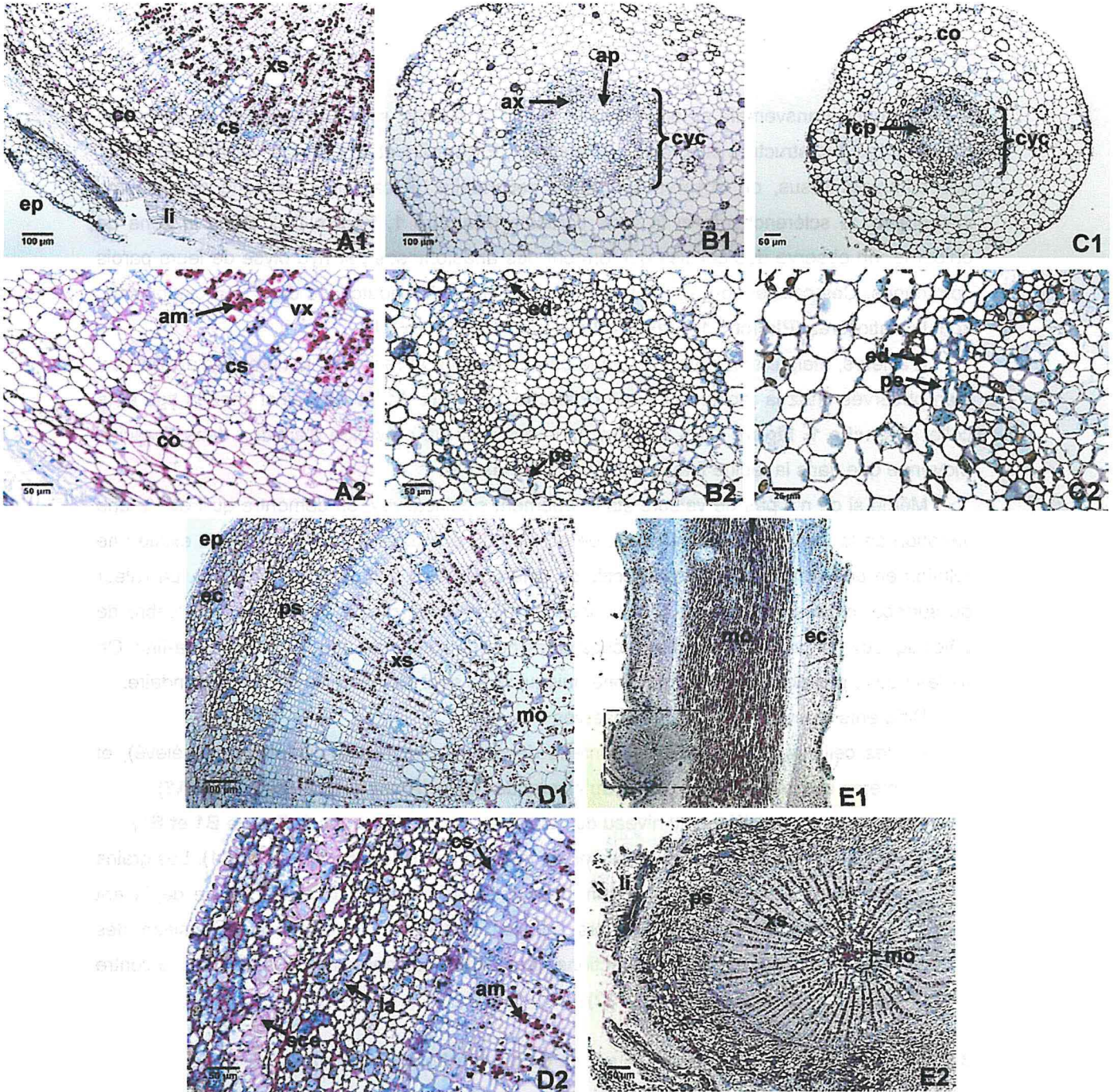
### 3.2 Régulation de l'expression des gènes de biosynthèse d'éthylène

Dans le but d'identifier des gènes marqueurs d'un stress particulier, le travail présenté ici porte sur la recherche d'expression différentielle de 16 gènes en réponse aux traitements hormonaux et abiotiques.

**Au niveau spatio-temporel**, la description des niveaux d'expression avant les traitements (blessure, éthylène, stress hydrique) montre les valeurs de base d'expression de gènes impliqués dans la biosynthèse d'éthylène et le système antioxydant selon les tissus (**Tableau 6**).

**Au niveau foliaire**, le *SAMS* est bien exprimé même s'il y a une diminution de transcrite au bout de 16h. Les *ACS* sont très faiblement et pourraient donc être potentiellement les facteurs limitant la biosynthèse de l'éthylène. Les *ACO*s sont différentiellement exprimés, notamment





**Planche 1. Description histologique de différents organes de somaplants de 1 an d'hévée issus de l'embryogenèse somatique (coloration à l'acide périodique Schiff et le Naphthol Blue Black).**

Figure A1 et A2. Coupe transversale de la racine moyenne.

Figure B1 et B2. Coupe transversale de la racine fine.

Figure C1 et C2. Coupe transversale de la racine extra-fine.

Figure D1 et D2. Coupe transversale de la tige.

Figure E1. Coupe longitudinale du collet.

Figure E2. Coupe transversale du collet au niveau d'une racine adventive.

ep : épiderme ; li, liège ; co : cortex ; cs : cambium secondaire ; ap : arche du phloème primaire ; ax : arche du xylème primaire ; xs : xylème secondaire ; cyc : cylindre central ; ed : endoderme ; pe : péricycle ; am : réserve d'amidon ; sce : sclérenchyme ; la : cellule laticifère ; mo : moelle ; ps : phloème secondaire ; ec : écorce, vx : vaisseaux du xylème.



l'ACO3 est très fortement exprimé par rapport aux deux autres gènes. Enfin, peu de transcrits sont accumulés pour le gène CAS.

**Au niveau de l'écorce**, le SAMS est fortement exprimé (234 unités), tandis que les ACSs sont toujours très faiblement exprimés. Pour les ACOs qui sont différenciellement exprimés, on note que le gène ACO1 est fortement induit à 16h. Les transcrits du gène CAS tendent aussi à s'accumuler en fin de journée.

Par contre, **au niveau racinaire**, les gènes SAMS et ACS sont très faiblement exprimés alors que les ACOs sont plutôt bien exprimés sauf ACO1. Pour le gène CAS, on note une forte accumulation de transcrit entre 12h et 16h. Donc, il semble que l'expression des gènes ACOs et CAS ne soit pas un facteur limitant de la biosynthèse de l'éthylène et de la détoxification du CN dans les racines.

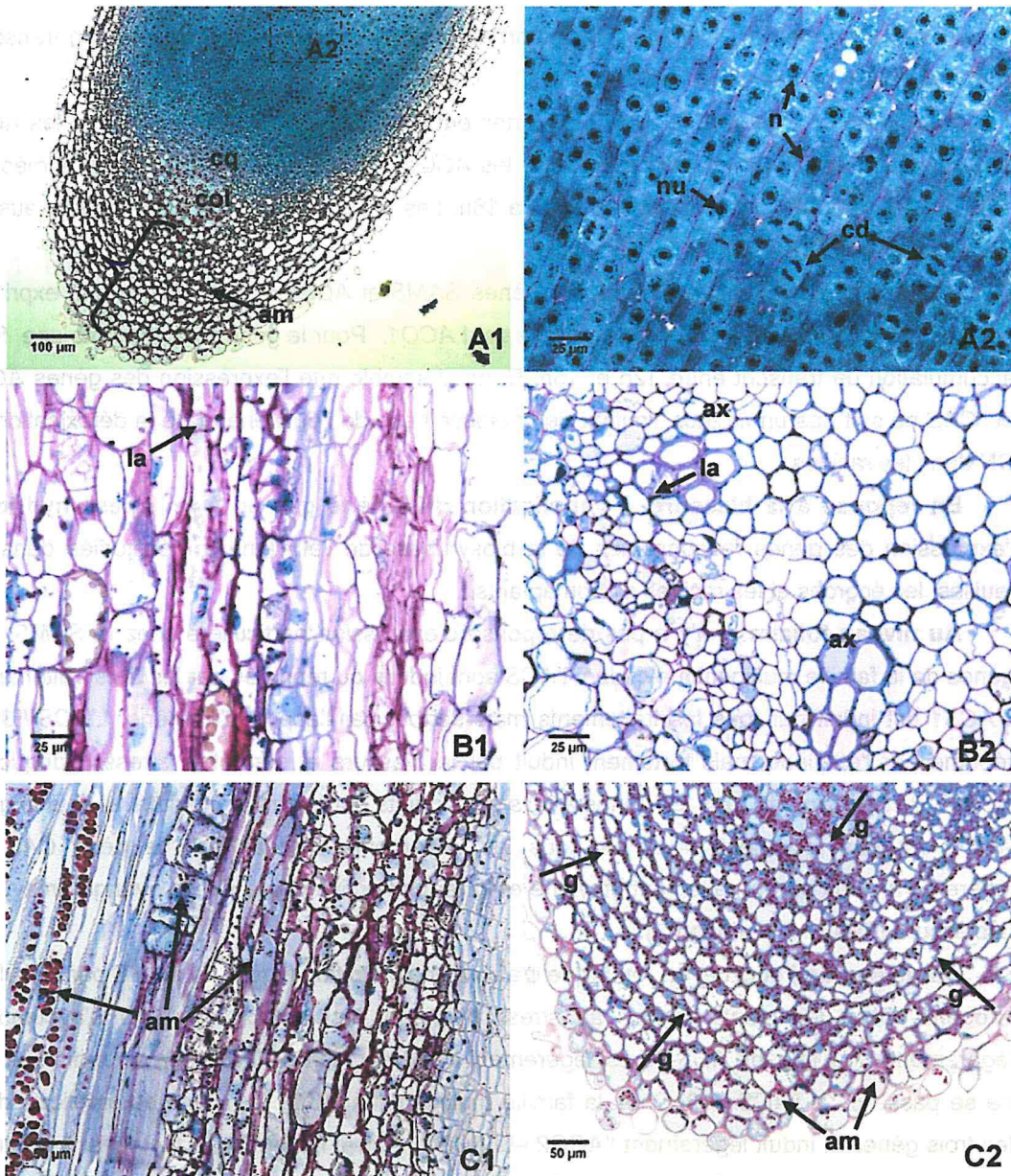
**En réponse à la blessure, à l'application d'éthylène gaz ou à un stress hydrique**, l'expression des gènes responsables de la biosynthèse de l'éthylène a été étudiée dans les feuilles, les écorces et les racines de somaplants.

**Au niveau foliaire**, il n'y a pas de réponse d'expression particulière chez le SAMS. Les gènes de la famille multigénique codant l'ACS sont induits ou réprimés par les trois traitements. L'ACS1 est induit par tous les traitements mais surtout par l'apport d'éthylène. L'ACS-F3 est réprimé par l'éthylène mais fortement induit par la blessure et surtout le stress hydrique, et ACS-F10 inversement. Tous les gènes ACOs sont induits par le stress hydrique et seul le gène ACO2 est très fortement induit par tous les traitements. Par ailleurs, le gène CAS est légèrement induit par le traitement éthylène et fortement activé par le stress hydrique mais pas la blessure (**Figure 8, Tableau 7**).

**Au niveau de l'écorce**, on remarque d'abord une inhibition légère de SAMS par l'éthylène exogène. Chez les plants soumis au stress hydrique, les transcrits d'ACS1 s'accumulent légèrement. Seul le gène ACS-F3 est légèrement induit par les trois traitements, tandis que rien ne se passe chez l'ACS-F10. Chez la famille multigénique ACO, l'éthylène est impliqué dans les trois gènes. Il induit légèrement l'ACO2 et l'ACO3, mais il inhibe l'ACO1. Pourtant, le stress hydrique n'induit que de façon significative l'ACO1 et inhibe légèrement l'ACO3 alors que la blessure induit de façon significative l'ACO2. Le CAS est légèrement activé par le stress hydrique (**Figure 8, Tableau 7**).

**Au niveau racinaire**, le gène SAMS est légèrement activé par le stress hydrique. En blessant les plants, on remarque une inhibition forte de l'ACSF3 et une activation de gène ACSF10. Le gène ACSF3 est aussi assez fortement inhibé dans la condition de stress hydrique. L'effet de l'éthylène ne se voit que dans l'expression d'ACO2 même s'il nous ne donne pas une valeur significative. Pourtant, l'éthylène inhibe légèrement l'ACO1 et le CAS. La blessure est impliquée dans l'activation légère d'ACO1 et d'ACS-F10 ainsi l'inhibition constitutive d'ACO3 (**Figure 8, Tableau 7**).

**En conclusion**, on a montré que :



**Planche 2. Description histologique de différents types cellulaires chez les somaplants de 1 an d'hévéa issus de l'embryogenèse somatique (coloration à l'acide périodique Schiff et le Naphthol Blue Black).**

Figure A1 et A2. Coupe longitudinale d'apex de la racine. Cellules méristématiques en division.

Figure B1. Coupe longitudinale montrant des cellules laticifères.

Figure B2. Coupe transversale avec des cellules laticifères.

Figure C1 et C2. Coupe longitudinale des cellules contenant des amyloplastes

am : réserve d'amidon ; c : coiffe ; cq : centre quiescent ; n : noyau ; nu : nucléole ; la : laticifères ; g : direction de gravitropisme ; cd : cellule en division ; col : columelle.



- le gène *SAMS* est fortement exprimé dans l'écorce et à un moindre niveau dans les feuilles et les racines, et que ce gène est peu régulé par les stress.
- les trois gènes *ACS*s sont faiblement exprimés dans les trois organes analysés. Par contre, ils sont fortement régulés dans les conditions de stress. Ils sont activés au niveau aérien quelque soit le traitement, et assez fortement inhibés au niveau racinaire par la blessure et le stress hydrique.
- les trois gènes *ACO*s sont exprimés à différents niveaux avant les traitements, l'*ACO3* étant le plus fortement exprimé au niveau foliaire (1407 unité) et l'*ACO2* à l'intermédiaire (20 unité) au niveau racinaire. On remarque une forte inhibition d'*ACO1* par l'éthylène au niveau de l'écorce et d'*ACO3* par la blessure au niveau racinaire.
- et enfin, le gène *CAS* est moyennement exprimé dans les écorces et les racines à la base et induit par le stress hydrique dans ces organes. Très faiblement exprimé au niveau des feuilles, l'application d'éthylène mais surtout le stress hydrique induisent fortement l'expression de ce gène.

### 3.3 Régulation de l'expression des gènes des systèmes de détoxification des espèces activées de l'oxygène

Dans un deuxième temps, l'expression des gènes impliqués dans le système de détoxification des espèces activées de l'oxygène a été étudiée dans les trois organes avant (**Tableau 6**) au niveau spatio-temporel et après (**Tableau 8**) traitements.

**Au niveau foliaire**, les deux gènes *SOD* sont bien exprimés avec une tendance à la diminution de la quantité de transcrits vers 16h, la *MnSOD* ayant un niveau de base plus élevé. La *CAT* s'exprime aussi malgré une tendance de diminution de transcrit vers 16h. Par ailleurs, une différence est visible pour les deux isoformes d'*APX*. En effet, l'*APX1* a un niveau d'expression très élevé comparé à l'*APX2*, même si une tendance de diminution de transcrit vers 16h est observée pour les deux gènes. D'autre part, les gènes *MDHAR* et *GCL* cytosolique s'expriment faiblement alors que le gène *GCL* chloroplastique a un niveau plus fort, comparable à celui de *CuZnSOD* et de *CAT*.

**Au niveau de l'écorce**, on retrouve une différence entre les deux isoformes de *SOD*, la *MnSOD* ayant un niveau d'expression plus élevée que celui de la *CuZnSOD*. La *CAT* s'exprime faiblement mais son niveau d'expression augmente vers 16h. Pour les deux *APX*s, le phénomène observé chez les feuilles est encore plus flagrant dans l'écorce. Le gène *APX1* a un niveau d'expression très élevé comparé avec celui d'*APX2*. De plus, le gène *MDHAR* s'exprime plus dans l'écorce que dans les feuilles. Quant aux *GCL*s, elles s'expriment moins que dans les feuilles. Globalement, une baisse du niveau d'expression est observée entre 12h et 16h sauf pour la *CAT*.

**Au niveau racinaire**, le gène *MnSOD* s'exprime là encore plus fortement que la *CuZnSOD*. En revanche, la *CAT* s'exprime très faiblement. De plus, *APX1* s'exprime très fortement et plus que dans les feuilles ou dans l'écorce alors que le niveau d'expression

**Tableau 5.** Description anatomique et structurale de différents types des racines de vitroplants de 1 an issus de l'embryogenèse somatique avec deux types de coupe : longitudinale (L) et transversale (T). L'estimation de la surface du cylindre central et de la totalité de la racine est réalisée à l'aide du logiciel d'analyse d'image (ImageJ). MDV représente la Moyenne de Valeur.

	Type des racines																
	Moyenne				Fine									Extra-fine			
Effectifs	M1	M2	M3	MDV	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	MDV	XF1	XF2	XF3	MDV
Type de coupe	T	T	L		T	T	T	T	T	L	L	L		T	L	L	
Surface totale (ST) (mm <sup>2</sup> )	7,8	0,84	2,72	3,79	1,1	1,8	1,45	1,62	1,63	1,02	0,56	0,91	1,26	0,64	0,5	0,068	0,41
Surface de cylindre central (SC) (mm <sup>2</sup> )	4,8	0,12	1,25	2,06	0,11	0,14	0,13	0,99	0,96	0,28	0,25	0,08	0,37	0,07	0,05	0,005	0,042
SC/ST (%)	61,54	14,29	45,96	40,59	10	7,78	8,97	61,11	58,90	27,45	44,64	8,79	28,45	10,94	10	7,35	9,43
Présence de phloème secondaire	oui	oui	oui	oui	non	non	non	non	non	non	non	non	non	non	non	non	non
Pôles ligneux primaires (N°)	-	-	-	-	5	7	5	5	5	-	-	-	5 à 7	4	-	-	4
Présence de bois secondaire	oui	oui	oui	oui	non	non	non	non	non	non	non	non	non	non	non	non	non
Réserve d'amidon	+++				++									+			

d'*APX2* est légèrement plus fort dans les racines que dans les autres tissus testés. De même, le gène *MDHAR* s'exprime plus fortement dans les racines que dans les autres tissus. Concernant les *GCLs*, le niveau de base de *GCL* cytosolique est plus faible dans les racines que dans les autres tissus contrairement à *GCL* chloroplastique.

En réponse à la blessure, à l'application d'éthylène gaz ou à un stress hydrique, l'expression de ces gènes dans trois organes de la plante est analysée (**Figure 9, Tableau 8**).

**Au niveau foliaire**, l'expression de *CuZnSOD* est induite en réponse à l'éthylène et reste constitutive en réponse à la blessure et au stress hydrique. L'expression de *MnSOD* est réprimée en réponse à la blessure et au stress hydrique et est constitutive en réponse à l'éthylène. Les gènes *CAT* et *MDHAR* restent constitutifs en réponse aux trois traitements. L'expression du gène *GCL* cytosolique est fortement induit en réponse à l'éthylène et inhibée en réponse à la blessure et au stress hydrique. Par contre, l'expression du gène *GCL* chloroplastique est stimulée par l'éthylène et le stress hydrique et reste constitutif en réponse à la blessure. L'expression des deux isoformes d'*APXs* est stimulée en réponse à l'éthylène, l'expression d'*APX1* est réprimée par la blessure et le stress hydrique.

**Au niveau d'écorce**, l'expression de la *CuZnSOD* est inhibée par le stress hydrique. Par ailleurs, l'éthylène stimule l'expression de la *MnSOD*. L'expression de *CAT* est réprimée en réponse à la blessure et à l'éthylène mais est stimulée légèrement par le stress hydrique. La *GCL* cytosolique a une expression constitutive alors que l'expression de *GCL* chloroplastique est légèrement induite par le stress hydrique. De même, l'*APX1* et l'*MDHAR* ont une expression constitutive alors que l'expression d'*APX2* est inhibée par l'éthylène et légèrement stimulée par le stress hydrique.

**Au niveau racinaire**, l'éthylène stimule l'expression de la *CuZnSOD* et de la *GCL* cytosolique. Par contre, l'éthylène inhibe l'expression des autres gènes dans les racines. Le stress hydrique et la blessure répriment aussi l'expression de la *CuZnSOD* et de la *GCL* cytosolique.

**En conclusion**, on a montré que :

- les deux gènes *SODs* sont bien exprimés au début. L'expression de *CuZnSOD* est exprimée en réponse à l'éthylène au niveau aérien et réprimée au niveau racinaire en réponse de la blessure et du stress hydrique.
- le gène *CAT* est faiblement exprimé au début dans tous les organes. Les stress appliqués bloquent son expression au niveau de l'écorce et racinaire.
- dans tous les organes, les gènes *APXs* sont bien exprimés voire une très forte accumulation d'*APX1* au début. L'application du stress tend à diminuer le transcrit de gènes *APX*.
- les gènes *GCLs* sont différemment exprimés. Ces gènes sont exprimés en réponse à l'éthylène contrairement aux autres stress. Le gène *GCL* cytosolique est réprimé au niveau racinaire au début, et il reste dans le même état après le traitement. Le gène

**Tableau 6.** Comparaison de l'expression de gènes impliqués dans la biosynthèse d'éthylène et du système de détoxification des espèces activées de l'oxygène chez les somaplants de 1 an du clone de PB 260. Les valeurs sont multipliées par  $10^{-5}$ .

Organes	Durée	SAMS	ACS1	ACSF3	ASCF10	ACO1	ACO2	ACO3	CAS
Feuille	12h	25 ± 27	0,3 ± 0,1	0,05 ± 0,01	0,3 ± 0,4	7 ± 4	6 ± 0,1	1407 ± 1886	8 ± 2
	16h	9,4	0,1	4,4	0,01	7	27	2500	3,5
Ecorce	12h	234 ± 91	3 ± 0,6	0,6 ± 0,3	0,8 ± 0,6	1 ± 0,1	5 ± 5	21 ± 6	60 ± 2
	16h	355	1	2,3	0,6	101	5,5	8	180
Racine	12h	7 ± 3	2 ± 2,5	2,4 ± 3,3	1 ± 1	1 ± 1	20 ± 11	287 ± 387	103 ± 51
	16h	5,5	2	0	2	4,7	23	16	567
Organes	Durée	CuSOD	MnSOD	CAT	APX1	APX2	MDHAR	GCLcyt	GCLchl
Feuille	12h	26 ± 35	1450 ± 14	20 ± 14	2980 ± 184	0,2 ± 0,1	1,3 ± 0,6	1 ± 0,2	33 ± 9
	16h	4	806	9	2160	0,03	1,3	0,03	36
Ecorce	12h	1 ± 2	48 ± 12	0,7 ± 0,1	14760 ± 12021	1 ± 0,2	15 ± 16	0,2 ± 0,22	20 ± 4
	16h	1	16	2	12540	3,3	14	0	15
Racine	12h	2 ± 2	16 ± 12	0,1 ± 0,1	24495 ± 18873	3 ± 1	21 ± 10	0,02 ± 0,03	128 ± 91
	16h	0	8	0,1	14870	1,1	87	0	335



GCL chloroplastique est fortement exprimé au niveau aérien, tandis qu'il est réprimé au niveau racinaire.

### 3.4 Préparation d'extrait d'ARN totaux de racines en vue du séquençage d'ADN

Grâce au clonage par embryogenèse somatique, nous pouvons disposer de racines du clone PB 260. Les ARN totaux de 3 types racinaires, correspondant à deux niveaux de différenciation du phloème et du xylème, de somaplants à 3 stades de développement et sous 3 traitements ont été extraits et mélangés afin de créer une collection de gènes exprimés dans les racines d'hévéa. Les ARN totaux de racines moyennes, fines et extra-fines de somaplants non traités âgés de 1 mois, 1 an et 3 ans, et de somaplants de 1 an traités par la blessure, l'éthylène et le stress hydrique ont été extraits. Un mélange proportionnel d'ARN a été réalisé puis envoyé à la société GATC pour séquençage sur une plateforme GS FLX (Roche / 454) avec le kit de séquençage Titanium run. Les séquences et le score seront mis en format texte (FastA & FastQ-Files). Le clustering sera réalisé sur un pipeline d'analyse semi-automatique GS FLX Assembly (ace format, Consed compatible). Les flowgrams (sff files) et le rapport statistique seront analysés. Cette approche de séquençage permet d'obtenir 200 Mb à partir de 500.000 lecture de 400 pb par échantillon. Ainsi, une couverture totale des gènes exprimés dans les racines sous différentes conditions environnementales pourrait être obtenue.

## 4 DISCUSSION

### 4.1 Description anatomique des racines d'autres types variétaux d'hévéa (jeune plantule, semis, microbouture) en comparaison avec les somaplants

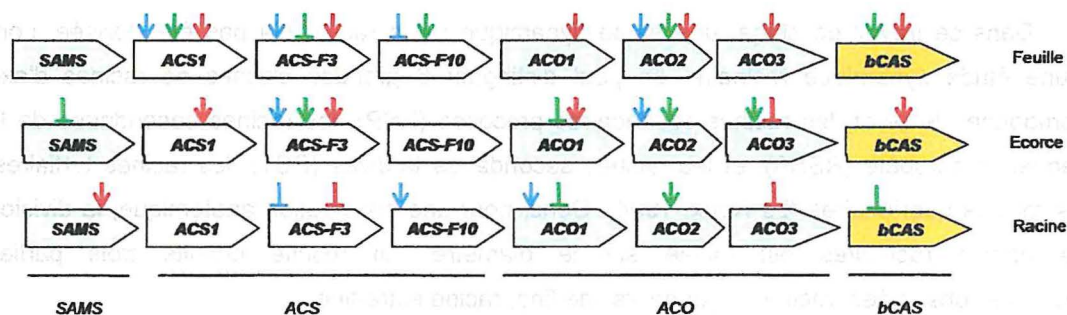
Dans ce travail de stage, une étude dynamique de la racine n'a pas été réalisée. Lors d'une étude dynamique racinaire, on peut distinguer 6 grandes classes de racines d'axe homogène : le pivot, les racines secondaires précoces (RSP), les racines secondaires de la séquence acropète (RSSA), et les racines secondaires tardives (RST), les racines tertiaires, les racines quaternaires (Le Roux, 1994). Donc, pour une observation anatomique, la division de parties racinaires est basée sur le diamètre qui résulte ensuite trois parties racinaires observées: racine moyenne, racine fine, racine extra-fine.

Le Roux (1994) dans son travail sur l'anatomie racinaire des semis et des microboutures de semis du clone GT1 a démontré des différences dans les caractéristiques histologiques des racines d'hévéa : la complexité vasculaire, la surface totale et de la stèle. Il a significativement démontré une diminution de surface totale ainsi que de la stèle du pivot aux racines tertiaires. Cette diminution se retrouve aussi chez les somaplants de 1 an de racine moyenne à racine extra-fine, même si les valeurs ne sont pas encore significatives.

En ce qui concerne les pôles ligneux, leur nombre se diminue tout au long du pivot jusqu'à la racine tertiaire (Le Roux, 1994). On peut dire que dans les racines de somaplants, on trouve le même phénomène dans les trois types de racines.

**Tableau 7.** Expression de gènes impliqués dans la voie de biosynthèse d'éthylène de somaplants de 1 an du clone PB 260 issus de l'embryogenèse somatique sous différents traitements (blessure, éthylène, et stress hydrique) dans différents organes. Les chiffres encadrés indiquent des valeurs importantes mais pas significatives. Les boîtes colorées montrent le gène surexprimé significativement avec p-value <0,25 (en rouge), le gène non-régulé (en orange), et le gène sous-exprimé significativement (en vert).

Traitement	Durée	Organe		Gènes							
				SAMS	ACS1	ACSF3	ASCF10	ACO1	ACO2	ACO3	CAS
Blessure	4h	Feuille	Ratio	1,16	8,40	35,77	0,09	0,99	50,39	2,46	0,85
			p-value	0,87	0,22	0,42	0,51	0,99	0,08	0,43	0,62
		Ecorce	Ratio	0,97	0,61	9,72	0,33	1,31	6,26	1,40	1,00
			p-value	0,93	0,38	0,35	0,41	0,73	0,11	0,43	0,98
		Racine	Ratio	0,82	0,11	0,01	2,63	2,96	0,40	0,02	0,61
			p-value	0,73	0,47	0,50	0,24	0,16	0,32	0,49	0,46
Ethylène	8h	Feuille	Ratio	0,84	36,34	0,06	11,11	1,09	3,95	1,75	3,93
			p-value	0,40	0,16	0,00	0,14	0,72	0,17	0,41	0,11
		Ecorce	Ratio	0,11	0,43	4,51	1,39	0,00	6,14	3,00	1,10
			p-value	0,00	0,21	0,36	0,64	0,00	0,27	0,44	0,81
		Racine	Ratio	0,93	1,29	-	1,14	0,21	32,85	1,48	0,63
			p-value	0,87	0,55	0,40	0,66	0,00	0,29	0,54	0,16
Sécheresse	3sem	Feuille	Ratio	0,22	2,31	349,53	0,29	5,66	121,31	6,69	32,20
			p-value	0,49	0,14	0,30	0,59	0,06	0,35	0,05	0,14
		Ecorce	Ratio	0,46	8,71	5,64	1,16	8,29	0,43	0,46	5,19
			p-value	0,29	0,09	0,39	0,83	0,24	0,52	0,19	0,35
		Racine	Ratio	2,10	0,49	0,02	0,46	0,79	1,75	0,19	2,18
			p-value	0,22	0,65	0,50	0,57	0,81	0,65	0,55	0,50



**Figure 8.** Régulation de gènes de biosynthèse de l'éthylène dans les trois organes observés sous trois différents traitements chez les somaplants de 1 an du clone PB 260 issus de l'embryogenèse somatique. Une flèche ↓ indique une activation par blessure, ↓ indique une activation par éthylène, ↓ indique une activation par le stress hydrique. Un tiré ⊥ indique une inhibition par blessure, ⊥ indique une inhibition par éthylène, ⊥ indique une inhibition par le stress hydrique.

Dans une autre étude, des structures primaires de la racine en coupe transversale ont été montrées chez les plantules issues de l'embryogenèse somatique d'hévéa (Carron et al., 2000 ; Marteaux, 2004). Cette structure ne se retrouve que dans les racines fines et extra-fines, mais pas dans les racines moyennes chez les somaplants ayant déjà une structure avancée comme dans la tige et le collet.

En ce qui concerne des structures secondaires de la racine, la présence de cambium secondaire, la formation de xylème et de phloème secondaire, ont été démontrées de pivot de jeune semis en coupe transversale (Le Roux, 1994). Dans l'étude chez les somaplants, on considère que, même si on n'a pas bien spécifiquement étudié le pivot, les racines moyennes ont la même structure secondaire, puis qu'elles sont débranchées du pivot (ordre secondaire).

On pourrait donc distinguer deux types de racines en ce qui concerne les caractéristiques anatomiques. Des racines à fort diamètre apical, à nombre de pôles ligneux primaires élevé et stèle d'importance relative faible (ex. pivot, racine moyenne) s'opposent à des racines fines, à nombre de pôles ligneux peu développé et stèle bien développé (ex. racine fine et extra-fine). Les premières ont principalement un rôle de conduction longitudinale de l'eau et des éléments minéraux. Les secondes vont privilégier l'absorption hydro-minérale grâce à un cortex peu développé qui facilite le transport radial de l'eau et des éléments minéraux. La description de racine moyenne montre qu'elle pourrait avoir un rôle intermédiaire entre le pivot et les racines fines comme Le Roux (1994) avait démontré chez les racines secondaires.

Une prochaine étude dynamique racinaire serait bien pour pouvoir vraiment compléter et comparer ce qui avait été fait chez les semis et les microboutures de semis.

#### 4.2 Régulation de l'expression des gènes de biosynthèse de l'éthylène

L'expression des gènes de biosynthèse de l'éthylène dépend d'une régulation spatio-temporelle et des trois traitements étudiés. Au départ, tous les gènes s'expriment différemment dans tous les organes. Dans les racines, les stress appliqués tendent à réprimer l'expression des gènes, sauf pour le gène *ACO2* particulièrement induit par l'éthylène.

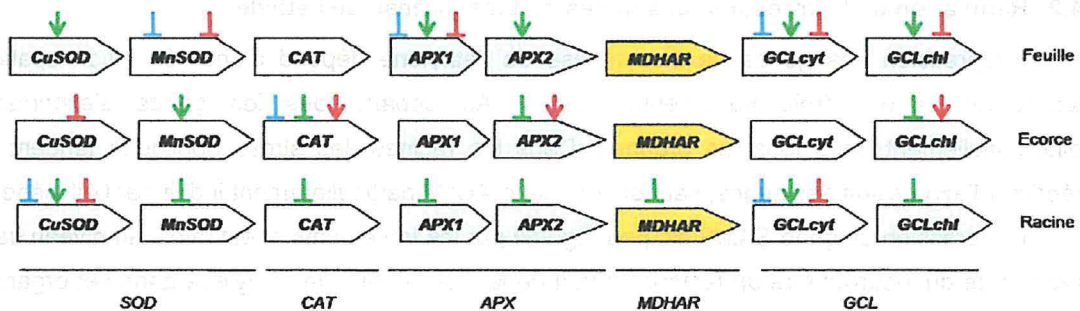
L'expression du gène *SAMS* est peu régulée par les traitements et est faible au niveau des racines ce qui pourrait être un facteur limitant de la biosynthèse de l'éthylène dans cet organe. De manière intéressante, les gènes *ACS-F3* et *ACO2* sont contrôlés par l'ensemble des traitements ce qui en fait des cibles de la réponse aux stress abiotiques. Le cyanure produit à équimolarité lors de la production d'éthylène est détoxiqué par la  $\beta$ CAS qui catalyse la formation de la  $\beta$ -cyanoalanine et l'aspartate. L'expression du gène *CAS* n'est pas un facteur limitant, et joue a priori son rôle indispensable à la survie de la cellule.

A ce jour, les analyses d'expression au niveau de l'écorce ont été réalisées à plusieurs stades de développement chez l'hévéa : première unité de croissance de somaplants de 1 an (ce travail) et de plants greffés (Kuswanhadi, 2006), et à partir d'écorces d'arbres de 4 ans exploités ou non en plantation (Kuswanhadi, 2006).



**Tableau 8.** Expression de gènes impliqués dans le système de détoxification des espèces activées de l'oxygène de somaplants de 1 an du clone PB 260 issus de l'embryogenèse somatique sous différents traitements (blessure, éthylène, et stress hydrique) dans différents organes. Les chiffres encadrés indiquent des valeurs importantes mais pas significatives. Les chiffres encadrés indiquent des valeurs importantes mais pas significatives. Les boîtes colorées montrent le gène surexprimé significativement avec p-value <0,25 (en rouge), le gène non-régulé (en orange), et le gène sous-exprimé significativement (en vert).

Traitement	Durée	Organe		Gènes							
				CuSOD	MnSOD	CAT	APX1	APX2	MDHAR	GCLcyt	GCLchl
Blessure	4h	Feuille	Ratio	0,74	0,55	0,67	0,66	1,32	0,40	0,62	0,69
			p-value	0,84	0,02	0,62	0,08	0,60	0,33	0,20	0,30
		Ecorce	Ratio	0,89	0,69	0,48	0,85	1,20	0,46	0,50	0,78
			p-value	0,85	0,29	0,10	0,84	0,35	0,60	0,63	0,40
		Racine	Ratio	0,03	0,25	0,46	0,46	0,62	0,61	0,09	0,46
			p-value	0,50	0,39	0,54	0,50	0,36	0,45	0,46	0,47
Ethylène	8h	Feuille	Ratio	17,61	0,89	1,01	4,78	76,28	2,13	199,58	7,42
			p-value	0,19	0,56	0,98	0,46	0,36	0,56	0,16	0,43
		Ecorce	Ratio	1,28	1,76	0,06	2,11	0,22	1,21	-	0,56
			p-value	0,63	0,20	0,00	0,40	0,02	0,73	0,14	0,04
		Racine	Ratio	31,49	0,24	0,14	0,46	0,70	0,09	40,52	0,12
			p-value	0,08	0,01	0,00	0,01	0,02	0,00	0,09	0,00
Stress hydrique	3sem	Feuille	Ratio	0,35	0,79	0,93	0,14	0,42	0,42	0,39	0,57
			p-value	0,62	0,03	0,91	0,03	0,26	0,35	0,06	0,20
		Ecorce	Ratio	0,06	1,31	1,97	0,90	2,80	1,06	0,34	1,74
			p-value	0,51	0,59	0,15	0,89	0,02	0,95	0,55	0,17
		Racine	Ratio	0,00	0,22	0,45	0,50	0,73	1,52	0,10	0,90
			p-value	0,49	0,39	0,54	0,52	0,62	0,63	0,47	0,90



**Figure 9.** Régulation de gènes du système antioxydant dans les trois organes observés sous trois différents traitements chez les somaplants de 1 an du clone PB 260 issus de l'embryogenèse somatique. Une flèche ↓ indique une activation par blessure, ↓ indique une activation par éthylène, ↓ indique une activation par le stress hydrique. Un tiré ⊥ indique une inhibition par blessure, ⊥ indique une inhibition par éthylène, ⊥ indique une inhibition par le stress hydrique.

L'étude de l'expression de gènes de biosynthèse de l'éthylène dans l'écorce **des plants greffés** du clone PB 260 a démontré qu'on n'a trouvé aucun effet de l'éthylène. Par contre, cette étude montre l'effet majeur du stress hydrique sur toute la voie de biosynthèse de l'éthylène, sauf le *SAMS* mais qui est activé au niveau racinaire. Une étude des effets du stress hydrique au niveau de l'écorce de plants greffés permettrait de conclure sur la régulation de ces gènes.

Au cours du développement des plants d'hévéa, le gène *ACS1* est exprimé dans les tissus **des arbres matures** après traitement de l'éthéphon. Cela pourrait être du au fait que l'expression de ce gène est transitoire. Pourtant, les gènes *ACOs* montrent des profils d'expression différents entre-eux. La forte réponse d'*ACO2* à la stimulation au niveau aérien tend à s'amenuiser au cours de l'exploitation des arbres. Ainsi, le gène *ACO3* répond à l'éthéphon par une surexpression (Kuswanhadi, 2006).

Les stress appliqués au niveau aérien semblent avoir un effet sur la répression des gènes de biosynthèse de l'éthylène au niveau racinaire. Si cette répression inhibe la production d'éthylène, elle pourrait agir sur l'arrêt de la croissance des racines. En effet, l'éthylène est connu pour avoir un effet positif sur le développement racinaire (Tanimoto et al., 1995 ; Masucci and Schiefelbein, 1996 ; Cervantes and Tocino, 2005 ).

Le stress hydrique a un impact plus important au niveau aérien qu'au niveau racinaire. La feuille est l'organe dans lequel les gènes s'expriment fortement en réponse à la blessure et à l'éthylène. Le stress hydrique bloque l'expression de gènes de biosynthèse de l'éthylène au niveau racinaire. Il faut remarquer que l'éthylène s'implique dans l'expansion radiale mais pas l'élongation des racines (Cervantes and Tocino, 2005). Donc, il semble que sa biosynthèse soit bloquée par le stress, pour que les racines ne se développent pas radicalement pour chercher de l'eau sous sol.

L'implication d'éthylène à l'architecture racinaire n'est pas encore claire. Des connaissances générales montrent que l'éthylène intervient dans plusieurs voies de signalisation hormonale (cytokinine, auxine) qui régulent l'initiation des racines latérales, la différenciation vasculaire, la dominance des racines apicales et le gravitropisme. Une hypothèse se pose que la concentration d'éthylène dans les cellules pourrait induire ces hormones et pourrait être régulé par les mêmes hormones (Aloni et al., 2005).





#### 4.3 Régulation de l'expression des gènes des systèmes de détoxification des espèces activées de l'oxygène

L'analyse de l'expression des gènes impliqués dans le système de détoxification des espèces activées de l'oxygène permet de montrer que ces gènes ont un comportement différentiel en fonction de l'organe et du traitement appliqué. En effet, il ressort que tous les gènes s'expriment dans tous les tissus sauf la *GCL* cytosolique qui a un niveau basal particulièrement bas. Les gènes dont l'expression est stimulée par l'éthylène n'ont pas une expression stimulée par le stress hydrique. La blessure ne semble pas avoir d'effet sur ces



**Tableau 9.** Les ARN sélectionnés à séquencer pour la constitution de banque d'EST des racines des somaplants issus de l'embryogenèse somatique de 1 an.

N°	Plant		Traitement				Quantité (µg)	Vol (µl)
	Âge (mois)	Organes	Type	[ ]	Durée	N° Tube		
1	3	Racine latérale	Contrôle			528	2	0,8
2	3	Pivot	Contrôle			529	2	0,7
3	3	Pivot apex	Contrôle			530	2	1,6
4	48	Racine moyenne	Contrôle			531	2	1,6
5	48	Racine fine	Contrôle			532	2	0,9
6	48	Racine extra-fine	Contrôle			534	2	2
7	12	Racine moyenne	Contrôle			460	2	0,5
8	12	Racine moyenne	Blessure		4h	454	2	1,8
9	12	Racine moyenne	Ethylène	1ppm	8h	466	2	2,5
10	12	Racine moyenne	Stress Hydrique		3 sem	496	2	1,5
11	12	Racine fine	Contrôle			461	2	0,8
12	12	Racine fine	Contrôle			491	2	1
13	12	Racine fine	Blessure		4h	485	2	1
14	12	Racine fine	Blessure		4h	479	2	1
15	12	Racine fine	Ethylène	1ppm	8h	509	2	1
16	12	Racine fine	Ethylène	1ppm	8h	473	2	1
17	12	Racine fine	Stress Hydrique		3 sem	497	2	1,1
18	12	Racine fine	Stress Hydrique		3 sem	503	2	2,2
19	12	Racine fine	Contrôle			492	2	1,6
20	12	Racine fine apex	Blessure		4h	486	2	2,8
21	12	Racine fine apex	Ethylène	1ppm	8h	468	2	1,4
22	12	Racine fine apex	Stress Hydrique		3 sem	516	2	9
23	12	Racine extra-fine	Contrôle			463	2	2,5
24	12	Racine extra-fine	Contrôle			493	2	0,8
25	12	Racine extra-fine	Blessure		4h	487	2	1,6
26	12	Racine extra-fine	Blessure		4h	481	2	2,6
27	12	Racine extra-fine	Ethylène	1ppm	8h	511	2	1
28	12	Racine extra-fine	Ethylène	1ppm	8h	475	2	1,4
29	12	Racine extra-fine	Stress Hydrique		3 sem	499	2	2,8
30	12	Racine extra-fine	Stress Hydrique		3 sem	505	2	2,2

	: Groupe1
	: Groupe2
	: Groupe3
	: Groupe4

gènes même s'il faut noter qu'un seul point à été analysé (4h après la blessure). Dans cette étude, plusieurs isoformes ont été étudiées pour tenir compte de la compartimentation cellulaire. Il n'est donc pas surprenant de voir des comportements différentiels entre les deux *SODs*, *GCLs* et *APXs*.

Ces données sont à comparer avec celles obtenues au niveau foliaire sur des plants greffés du clone de PB 260 réalisée en 2006 (Gébelin, 2006). A l'époque, l'expression des gènes a été faite par RT-PCR semi-quantitative et en cinétique. Si on ne prend en compte que les points 0 et 4h après blessure, les gènes avaient une expression constitutive sauf pour les gènes *GCL* cytosolique et chloroplastique dont l'expression était stimulée. Si on ne prend en compte que les points 0 et 8h de traitement à l'éthylène, les gènes testés étaient constitutifs sauf les deux *GCLs* dont l'expression était stimulée. En réponse au stress hydrique (9 semaines sans arrosage), seule l'expression de la *CuZnSOD* était fortement induite, celle des autres gènes restant constitutive.

Dans notre étude par PCR quantitative en temps réel sur des somaplants, les gènes sont globalement sous-exprimés, sauf la *MnSOD*, la *GCL* cytosolique, et l'*APX1* en réponse à la blessure. En réponse à l'éthylène, les résultats d'expression obtenues par les deux méthodes sont comparables, presque toutes les expressions des gènes testés sont stimulées, et en particulier celle de la *GCL* cytosolique. Par contre, en réponse au stress hydrique, les résultats obtenus à partir de somaplants et de plants greffés ne sont pas concordants. En effet, l'expression du gène *MnSOD*, des deux isoformes de *GCL*, et d'*APX1* est significativement réprimée en réponse au stress hydrique. La *CuZnSOD* a une expression constitutive, ce qui met en évidence une réponse différente entre le plant greffé et le somaplant âgé d'un an. On observe que la *CuZnSOD* et la *GCL* cytosolique sembleraient des marqueurs importants à la réponse aux stress oxydatifs dans ces deux types variétaux d'hévéa.

L'ensemble de ces résultats montre que, dans nos conditions d'expérience, la blessure et le stress hydrique n'activent pas d'expression des gènes impliqués dans le stress oxydatif. Etant donné qu'un seul point à été analysé, peut être que l'activation génique se fait avant ou après le point choisi. Le point de prélèvement a été choisi au regard des données d'expression obtenues dans les études précédentes mais chaque famille de gènes ne s'expriment pas forcément au même moment. Cette étude sera donc approfondie en réalisant une cinétique de stress hydrique contrôlée, jusqu'au point de flétrissement.

De plus, le compartiment cellulaire sollicité lors du stress est aussi une donnée importante pour comprendre la mise en place des mécanismes de tolérance. Le cytosol semblerait être le premier compartiment cellulaire qui répondrait à l'accumulation des EAO car deux gènes codant des protéines cytosoliques sont activés (la *CuZnSOD* et la *GCL* cytosolique). Cependant, il reste à déterminer la localisation des autres gènes comme la *CAT*, *APX1*, *APX2*, *MDHAR* qui n'est pas encore possible faute de séquences en plines-longueurs. L'analyse des données de séquençage permettrait d'isoler ces séquences plines-longueurs.

#### 4.4 Vers une base de données de séquences d'ADNc produits dans les racines

La constitution d'une base de données de séquences d'ADNc de racine revêt un intérêt pour identifier des gènes impliqués dans le développement racinaire et la réponse aux stress.

Dans le contrôle de développement racinaire chez *Arabidopsis*, certaines familles de gène ainsi que des facteurs de transcription déjà connus, sont impliqués. Deux gènes de famille GRAS, *SCARECROW (SCR)* et *SHORT-ROOT (SHR)*, sont nécessaires aux événements de divisions cellulaires de l'initiale de la différenciation radiale racinaire. Sept facteurs de fixation d'ADN et un régulateur transcriptionnel ont été montrés à contrôler le devenir des cellules et la formation des poils absorbants : *WEREWOLF (WER)*, *CAPRICE (CPC)*, *TRIPTYCHON (TRY)*, *ENHANCER OF TRY AND CPC (ETC1)*, *GLABRA2 (GL2)*, *GLABRA3 (GL3)*, et *TRANSPARENT TESTA GLABRA 1 (TTG1)* (Montiel et al., 2004). D'ailleurs, l'expression d'*ANR1*, un gène de domaine FTMADS, est régulée en réponse aux nitrates qui forme plus de racines latérales en présence de nitrates (Montiel et al., 2004), (Zhang and Forde, 1998). Récemment, l'expression du gène de *KNOTTED-LIKE 6* chez *Arabidopsis* (*KNAT6*), un membre de la famille du gène *KNOTTED-LIKE (KNOX)*, a été localisée dans le tissu de phloème de racine près des zones d'initiation des racines latérales, à la base des racines latérales mais pas dans les méristèmes (Dean et al., 2004).

Chez l'hévéa, la constitution d'une base de données de séquences ADNc de racines vise à identifier les gènes particuliers à ces tissus, et ceux impliqués dans le développement et la réponse aux stress grâce à la similarité de ces gènes avec ceux d'*Arabidopsis*.

## 5 CONCLUSION ET PERSPECTIVE

En conclusion, les gènes intervenant dans la biosynthèse de l'éthylène et les systèmes de détoxification des espèces activées de l'oxygène ont leur expression régulée différemment sur le plan spatio-temporel et en réponse aux stress abiotiques. Il y a une grande diversité d'accumulation de transcrits entre les trois organes surtout pour les gènes : *SAMS* fortement accumulé dans l'écorce, *ACO3* dans les feuilles, *CAS* dans les écorces et les racines, *MnSOD* dans les feuilles, et la très forte accumulation de *APX1* dans tous les organes, et de *GCLchl* dans les racines.

Les analyses d'expression ont été réalisées sur des racines moyennes. Ces racines ont mis en place un phloème secondaire et ont certainement un fonctionnement différent des racines fines et extrafines qui sont à un stade primaire.

Les structures anatomiques variées des trois différents types racinaires de somaplants se retrouvent chez les autres types variétaux (semis, microboutures). Cet état des lieux nécessite de mettre en place des dispositifs expérimentaux permettant de voir l'influence des types variétaux (boutures, microboutures, et somaplants) et des stress (blessure, éthylène, et stress hydrique) sur le développement des racines et leurs voies de régulation.



## 6 REFERENCES

- Aloni R, Aloni E, Langhans M, Ullrich CI** (2005) Role of Cytokinin and Auxin in Shaping Root Architecture: Regulating Vascular Differentiation, Lateral Root Initiation, Root Apical Dominance and Root Gravitropism. *Annals of Botany* **230**: 1-11
- Alscher RG, Erturk N, Heath LS** (2002) Role of superoxide dismutase (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *J Exp Bot* **53**: 1331-1341
- Borch K, Bouma TJ, Lynch JP, Brown KM** (1999) Ethylene: a regulator of root architectural responses to soil phosphorus availability. *Plant, Cell and Environment* **22**: 425-431
- Capitani G, Tschopp M, Eliot AC, Kirsch JF, Grutter MG** (2005) Structure of ACC synthase inactivated by the mechanism-based inhibitor L-vinylglycine. *FEBS Lett* **579**: 2458-2462
- Carron MP, Le Roux Y, Tison J, Dea BG, Caussanel V, Clair J, Keli J** (2000) Compared root system architectures in seedlings and *in vitro* plantlets of *Hevea brasiliensis*, in the initial years of growth in the field. *Plant and Soil* **223**: 73-85
- Cervantes E, Tocino A** (2005) Geometric analysis of *Arabidopsis* root apex reveals a new aspect of the ethylene signal transduction pathway in development. *J Plant Physiol* **162**: 1038-1045
- d'Auzac J** (1989a) The hormonal stimulation of latex yield : historical account. In J d'Auzac, JL Jacob, H Chrestin, eds. CRC Press Inc, Florida, pp 289-293
- Dean G, Casson S, Lindsey K** (2004) KNAT6 gene of *Arabidopsis* is expressed in roots and is required for correct lateral root formation. *Plant Mol Biol* **54**: 71-84
- Fernando-Lopez M, Goormachtig S, Gao M, D'Haese W, Van Montagu M, Holsters M** (1998) Ethylene-mediated phenotypic plasticity in root nodule development on *Sesbania rostrata*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 12724-12728
- Ferrand M** (1944) Phytotechnie de l'hévéa (*Hevea Brasiliensis*). Gembloux, Belgique
- Fisher DB** (1968) Protein staining of ribboned epon sections for light microscopy. *Histochemistry and Cell Biology* **16**: 92-96
- Gébelin V** (2006) Expression of genes involved in tolerance to oxidative stress in *Hevea brasiliensis* in response to various treatments. In *Génomique et technologies avancées des plantes*. Université Montpellier 2, Montpellier, p 21
- Giazer I, Orion D, Apelbaum A** (1983) Interrelationships between Ethylene Production, Gall Formation, and Root-knot Nematode Development in Tomato Plants Infected with *Meloidogyne javanica*. *J Nematol* **15**: 539-544
- Jez JM, Cahoon RE, Chen S** (2004) *Arabidopsis thaliana* glutamate-cysteine ligase: functional properties, kinetic mechanism, and regulation of activity. *J Biol Chem* **279**: 33463-33470
- Kende H** (1993) Ethylene biosynthesis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **44**: 283-307
- Kulka RG** (2008) Hormonal control of root development on epiphyllous plantlets of *Bryophyllum* (*Kalanchoe*) *marnierianum*: role of auxin and ethylene. *J Exp Bot* **59**: 2361-2370
- Kuswanhadi** (2006) Isolement et caractérisation des gènes ACS et ACO impliqués dans la biosynthèse de l'éthylène chez *Hevea brasiliensis*. Université Montpellier II, Montpellier
- Le Roux Y** (1994) Mise en place de l'architecture racinaire d'*Hevea brasiliensis*. Etude comparée du semis et de la microbouture. Doctorat. Faculté des Sciences et Techniques Saint-Jérôme, Aix Marseille III
- Marteaux B** (2004) Mise au point d'une technique d'hybridation *in situ* adaptée aux plantules et écorces d'*Hevea brasiliensis* : caractérisation de l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme laticifère. In P Montoro, L Alemanno, eds. Université Montpellier 2, Montpellier, p 24
- Martoja R, Martoja-Pierson M** (1967) Initiation aux techniques de l'histologie animale. Ed. Masson, Paris
- Masucci JD, Schiefelbein JW** (1996) Hormones act downstream of *TTG* and *GL2* to promote root hair outgrowth during epidermis development in the *Arabidopsis* root. *Plant Cell* **8**: 1505-1517
- Mittler R** (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci* **7**: 405-410
- Montiel G, Gantet P, Jay-Allemand C, Breton C** (2004) Transcription Factor Networks : Pathways to the Knowledge of Root Development. *Plant Physiology* **136**: 3478-3485

- Montoro P, Carron M-P, Clément-Demange A, Jourdan C, Nurhaimi-Haris, Sumarmadji, Sumaryono** (2008) Integration of biotechnologies for rubber tree improvement. What about rootstock clones? *In* IRIEC, ed, IRRDB Workshop on Plant Material, Bogor, Indonesia
- O'Donnell PJ, Calvert C, Atzorn R, Wasternack C, Leyser HMO, Bowles DJ** (1996) Ethylene as a Signal Mediating the Wound Response of Tomato Plants. *Science* **274**: 1914-1917
- Rahman A, Hosokawa S, Oono Y, Amakawa T, Goto N, Tsurumi S** (2002) Auxin and ethylene response interactions during *Arabidopsis* root hair development dissected by auxin influx modulators. *Plant Physiol* **130**: 1908-1917
- Scandalios JG** (2005) Oxidative stress : molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz J Med Biol Res* **38**: 995-1014
- Tanimoto M, Roberts K, Dolan L** (1995) Ethylene is a positive regulator of root-hair development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **8**: 943-948
- Willekens H, Chamnongpol S, Davey M, Schraudner M, Langebartels C, Van Montagu M, Inze D, Van Camp W** (1997) Catalase is a sink for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and is indispensable for stress defence in C3 plants. *Embo J* **16**: 4806-4816
- Yang SF, Hoffman NE** (1984) Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **35**: 155-189
- Zhang HM, Forde BG** (1998) An *Arabidopsis* MADS box gene that controls nutrient-induced changes in root architecture. *Science* **279**: 407-409
- Zhang YJ, Lynch JP, Brown KM** (2003) Ethylene and phosphorus availability have interacting yet distinct effects on root hair development. *J Exp Bot* **54**: 2351-2361
- Zhu C, Gan L, Shen Z, Xia K** (2006) Interactions between jasmonates and ethylene in the regulation of root hair development in *Arabidopsis*. *J Exp Bot* **57**: 1299-1308

# **Annexe**

### **Annexe 1. Prélèvement des échantillons**

Des différentes parties de la racine (racine moyenne entre 2 mm à 1 cm de diamètre, racine fine différenciée entre 1 à 2 mm de diamètre et apex, racine extra-fine différenciée à <1mm de diamètre et apex), ainsi leur partie aérienne : feuilles et écorces, sont prélevées à partir d'un vitroplant. Avant du prélèvement, les racines sont lavées quatre fois dans des bacs remplis de l'eau robinet pendant une demi-minute chacun d'eux pour désagréger les terreaux. Tout de suite, elles sont plongées en tampon phosphate en concentration 1M à pH 7 pendant une demi-minute. Les prélèvements sont réalisés en condition fraîche dans un bac de la glace. Les échantillons sont lavés chaque fois avec de l'alcool à 70% pour arrêter le développement de microorganisme avant de les plonger dans des tubes à 50ml rempli de l'azote. Ils sont conservés au congélateur à -80°C jusqu'à l'extraction d'ARN. Pour la partie histologie, les échantillons sont aussitôt immergés dans le fixateur sans les plonger dans de l'azote liquide.

### **Annexe 2. Protocole d'histologie**

#### **Fixation**

Les échantillons sont placés dans un fixateur aldéhydique (paraformaldéhyde 2 %, glutaraldéhyde et caféine 1 % dans tampon phosphate sodium 0.1 M pH 7.2), dégazés plusieurs fois sous vide pendant 15 minutes, puis laissés toute la nuit à 4°C.

#### **Déshydratation, imprégnation, inclusion**

Les échantillons sont déshydratés par une série de bains de concentrations croissantes en éthanol puis butanol. Le fixateur est remplacé par un bain d'éthanol 50(1h) puis 70(1h) renouvelé pour la nuit à 4°C. Ensuite la déshydratation est poursuivie : éthanol 70(45 mn) éthanol 95(2 bains d'1h) éthanol 100(1h) éthanol/butanol 50/50 (1 nuit à 4°C), butanol 100(passage sous vide pendant 30mn à 1h) L'imprégnation est réalisée dans le butanol pur /résine tissus durs 50/50 (sous vide pendant 1h et ensuite agitation pendant une nuit à 4°C). Le bain est remplacé par la résine tissue dure pure pour 3 jours. Les échantillons sont inclus dans la résine tissus durs + durcisseur. Ensuite, les échantillons inclus sont incubés dans une étuve à 37°C pour finaliser la polymérisation.

#### **Coupe, coloration, et montage**

Les échantillons inclus dans la résine sont montés sur des plots qui s'adaptent au microtome. Des coupes de 3 µm sont réalisées avec un microtome Leica RM2255; et déposées sur lames. Une double coloration est réalisée : après hydrolyse à l'acide périodique, les coupes sont colorées à l'acide périodique-Schiff (APS) pendant 15 minutes à l'obscurité et à température ambiante puis lavées à l'eau sulfureuse, à l'eau courante et à l'eau distillée. Elles sont ensuite colorées au Naphthol-blue black (NBB) chauffé à 50°C pendant 5 minutes et lavées à l'eau courante. La coloration est régressée à l'acide acétique 7% sous contrôle microscopique. L'APS met en évidence les polysaccharides (paroi et amidon) par une coloration rouge (Martoja et Martoja, 1967), tandis que le NBB colore les protéines en bleu-noir (Fisher, 1968). Les coupes sont ensuite montées entre lame et lamelle dans du liquide de montage (Isomount®).

### **Annexe 3. Extraction d'ARN par une méthode de coussin de césium**

L'ARN est extrait par une méthode de coussin de césium à partir de 1 g d'échantillon. Le broyage des échantillons est réalisé dans un mortier rempli d'azote liquide jusqu'à l'obtention d'une fine poudre. Le broyat est transféré dans un tube Falcon de 50 mL contenant 9,5 mL de tampon d'extraction mis sur la glace. Après que les broyats soient laissés pendant 10 minutes (agitation en vortex chaque 3 minutes), les tubes sont centrifugés à 10,000 g pendant 30 minutes à température de 4°C. Le surnageant est versé dans les tubes d'ultracentrifugation



préparés et remplis de 3 mL de césium chlorure (CsCl) pendant la centrifugation. Avec le tampon d'extraction le volume de chaque tube est complété à 1 cm au dessous du bord du tube. Les tubes sont positionnés dans un rotor de type SW28 Beckman et centrifugés pendant 20 heures à 20°C et la vitesse 32,000 rpm (82,705 g). Le coussin de césium permet aux ARN de passer la couche de césium chlorure au fond de tube. Le surnageant est délicatement éliminé et le culot est séché pendant 5 minutes. Le culot est lavé avec l'éthanol 70%, et laissé sécher pendant 1 heure avant d'être repris dans 100 µL d'eau stérile pour une conservation à -80°C. Les ADNc sont synthétisés à partir 2 µg d'ARN totaux des différents tissus étudiés.

#### Annexe 4. Synthèse d'ADNc

La synthèse d'ADN complémentaires (ADNc) se fait par transcription inverse. Les échantillons d'ARNs (4µg) sont mis en présence d'Oligo (DT)12 VN (100pmol, V=C,G,A, N=G,A,T,C) pendant 5 minutes à 70°C, température qui permet la dénaturation des ARNs, puis les tubes sont refroidis 3 minutes dans la glace. Un mélange réactionnel composé de tampon de réaction (5X, RevertAid™, Fermentas), de dNTP (10mM) et d'inhibiteur de RNase (RiboLock, Fermentas, 20U) est ajouté aux ARNs. Les tubes sont réchauffés pendant 5 minutes à 37°C pour pouvoir rajouter la transcriptase inverse (RevertAid™ M.MV Fermentas) qui va synthétiser les brins d'ADNc pendant 60 mnutes à 42°C. La réaction est par la suite stoppée en disposant les tubes pendant 10 minutes à 70°C.

#### Annexe 5. Programme de PCR Actine et PCR en temps réel « Mary Hévée CIRAD »

Etape	Cycle	Temp. (°C)	Type	Durée (sec)
<b>1. Programme de PCR avec des amorces Actines</b>				
Dénaturation	1	94	-	180
Amplification	40	94	-	30
		55	-	30
		72	-	30
Refroidissement	-	72	-	00
<b>2. Programme de PCR en temps réel « Mary Hévée CIRAD »</b>				
Dénaturation	1	95	-	300
Amplification	45	95	-	20
		60	-	15
		72	Single	20
Courbe de fusion	1	95	-	5
		65	-	60
		95	Continuos	Continuos
Refroidissement	-	40	-	30

Annexe 6. Récapitulatif de rendements des ARN de somaplants d'hévéa âgés de 1 an sous différents traitements (blessure, éthylène, sécheresse).

N°	Plant		Traitement			Prélèvement					Contrôle d'ARN								
	Organes	Type	[ ]	Durée	Effectifs	Date	Temps de la journée	Date	Poids (g)	Tube	Vol (µL)	Conc. (µg/µL)	Rdt (µg/gMF)	Ratio 260/280	Electro phorèse	PCR active	ADNg	DNase	Quantité
1	Racine moyenne	Blessure		4h	1	10.03.09	13h00	10.03.09	0,42	454	50	1,163	138,45	1,891	OK	OK	NON		
2	Racine fine	Blessure		4h	1	10.03.09	13h00	10.03.09	0,38	455	50	0,499	65,66	2,028	OK	OK	NON		
3	Racine fine apex	Blessure		4h	1	10.03.09	13h00	10.03.09	0,11	456	50	0,268	121,82	1,66	OK	OK	NON		
4	Racine extra-fine	Blessure		4h	1	10.03.09	13h00	10.03.09	0,11	457	50	0,445	202,27	1,802	OK	OK	NON		
5	Feuille	Blessure		4h	1	10.03.09	13h00	10.03.09	1,04	458	100	5,015	482,21	1,752	OK	OK	NON		
6	Ecorce	Blessure		4h	1	10.03.09	13h00	10.03.09	0,99	459	100	2,244	226,67	1,851	OK	OK	NON		
7	Racine moyenne	Contrôle			1	10.03.09	13h00	11.03.09	0,67	460	100	4,444	663,28	1,781	OK	OK	NON		
8	Racine fine	Contrôle			1	10.03.09	13h00	11.03.09	0,39	461	100	2,506	642,56	1,82	OK	OK	NON		
9	Racine fine apex	Contrôle			1	10.03.09	13h00	11.03.09	0,08	462	50	0,269	168,13	1,544	OK	OK	NON		
10	Racine extra-fine	Contrôle			1	10.03.09	13h00	11.03.09	0,16	463	50	0,809	252,81	1,731	OK	OK	NON		
11	Feuille	Contrôle			1	10.03.09	13h00	11.03.09	1,07	464	50	0,208	9,72	1,53	OK	OK	NON		
12	Ecorce	Contrôle			1	10.03.09	13h00	11.03.09	1,10	465	50	0,288	13,09	1,524	OK	OK	NON		
13	Racine moyenne	Ethylène	1ppm	8h	1	10.03.09	17h16	12.03.09	0,56	466	50	0,823	73,48	1,666	OK	OK	NON		
14	Racine fine	Ethylène	1ppm	8h	1	10.03.09	17h16	12.03.09	0,05	467	50	0,224	224,00	1,49	OK	OK	NON		
15	Racine fine apex	Ethylène	1ppm	8h	1	10.03.09	17h16	12.03.09	0,80	468	50	1,463	91,44	1,741	OK	OK	NON		
16	Racine extra-fine	Ethylène	1ppm	8h	1	10.03.09	17h16	12.03.09	0,35	469	50	0,669	95,57	1,979	OK	OK	NON		
17	Feuille	Ethylène	1ppm	8h	1	10.03.09	17h16	12.03.09	1,03	470	100	5,297	514,27	1,531	OK	OK	NON		
18	Ecorce	Ethylène	1ppm	8h	1	10.03.09	17h16	12.03.09	0,83	471	100	1,834	220,96	1,876	OK	OK	NON		
19	Racine moyenne	Ethylène	1ppm	8h	3	13.03.09	17h00	16.03.09	1,17	472	50	0,552	23,59	1,617	OK	OK	OUI	OUI	0,009
20	Racine fine	Ethylène	1ppm	8h	3	13.03.09	17h00	16.03.09	0,91	473	50	2,038	111,98	1,788	OK	OK	NON		
21	Racine fine apex	Ethylène	1ppm	8h	3	13.03.09	17h00	16.03.09	0,05	474	50	0,047	47,00	4,482	OK	OK	NON		
22	Racine extra-fine	Ethylène	1ppm	8h	3	13.03.09	17h00	16.03.09	0,49	475	50	1,485	151,53	1,701	OK	OK	NON		
23	Feuille	Ethylène	1ppm	8h	3	13.03.09	17h00	16.03.09	1,22	476	100	5,223	428,11	1,316	OK	OK	NON		
24	Ecorce	Ethylène	1ppm	8h	3	13.03.09	17h00	16.03.09	0,88	477	100	1,754	199,32	1,993	OK	OK	NON		
25	Racine moyenne	Blessure		4h	3	13.03.09	13h29	17.03.09	1,23	478	50	0,219	8,90	1,975	OK	OK	OUI	OUI	0,078
26	Racine fine	Blessure		4h	3	13.03.09	13h29	17.03.09	1,04	479	50	2,364	113,65	1,956	OK	OK	NON		
27	Racine fine apex	Blessure		4h	3	13.03.09	13h29	17.03.09	0,09	480	50	0,535	297,22	1,945	OK	OK	NON		
28	Racine extra-fine	Blessure		4h	3	13.03.09	13h29	17.03.09	0,30	481	50	0,789	131,50	2,157	OK	OK	NON		
29	Feuille	Blessure		4h	3	13.03.09	13h29	17.03.09	1,30	482	100	4,870	374,62	1,462	OK	OK	NON		

Annexe 6. Récapitulatif de rendements des ARN de somaplants d'hévéa âgés de 1 an sous différents traitements (blessure, éthylène, sécheresse).

N°	Plant		Traitement			Prélèvement					Contrôle d'ARN								
	Organes	Type	[ ]	Durée	Effectifs	Date	Temps de la journée	Date	Poids (g)	Tube	Vol (µL)	Conc. (µg/µL)	Rdt (µg/gMF)	Ratio 260/280	Electrophorèse	PCR active	ADNg	DNase	Quantité
59	Feuille	Ethylène	1ppm	8h	2	12.03.09	17h00	25.03.09	1,19	512	100	4,149	348,66	1,8	OK	OK	NON		
60	Ecorce	Ethylène	1ppm	8h	2	12.03.09	17h00	25.03.09	1,01	513	100	2,130	210,89	1,786	OK	OK	NON		
61	Racine moyenne	Sécheresse		3 sem	3	19.03.09	10h00	26.03.09	1,13	514	50	0,035	1,55	-1,526	OK	OK	OUI	OUI	-
62	Racine fine	Sécheresse		3 sem	3	19.03.09	10h00	26.03.09	0,60	515	50	0,352	29,33	1,848	OK	OK	OUI	OUI	0,106
63	Racine fine apex	Sécheresse		3 sem	3	19.03.09	10h00	26.03.09	0,13	516	50	0,221	85,00	1,508	OK	OK	NON		
64	Racine extra-fine	Sécheresse		3 sem	3	19.03.09	10h00	26.03.09	0,54	517	50	0,633	58,61	1,869	OK	OK	NON		
65	Feuille	Sécheresse		3 sem	3	19.03.09	10h00	26.03.09	1,16	518	100	1,309	112,84	1,926	OK	OK	NON		
66	Ecorce	Sécheresse		3 sem	3	19.03.09	10h00	26.03.09	1,03	519	100	0,409	39,71	2,057	OK	OK	OUI	OUI	0,188
67	Racine moyenne	Contrôle			1	14.03.09	17h00	31.03.09	1,15	520	50	0,011	0,48	-6,033	OK	OK	OUI	OUI	0,232
68	Racine fine	Contrôle			1	14.03.09	17h00	31.03.09	0,58	521	50	0,034	2,93	-2,329	OK	OK	OUI	OUI	0,309
69	Racine fine apex	Contrôle			1	14.03.09	17h00	31.03.09	0,02	522	50	-0,063	-157,50	0,961	OK	OK	NON		
70	Racine extra-fine	Contrôle			1	14.03.09	17h00	31.03.09	0,41	523	50	0,182	22,20	2,425	OK	OK	NON		
71	Feuille	Contrôle			1	14.03.09	17h00	31.03.09	1,19	524	100	3,109	261,26	1,921	OK	OK	NON		
72	Ecorce	Contrôle			1	14.03.09	17h00	31.03.09	0,95	525	100	1,687	177,58	1,804	OK	OK	OUI	OUI	0,147
73	Feuille	Contrôle			1	23.04.09	12h00	24.04.09	0,58	526	50	2,282	196,72	2,035	OK	OK	NON		
74	Ecorce	Contrôle			1	23.04.09	12h00	24.04.09	1,54	527	50	1,840	59,74	1,786	OK	OK	NON		
75	Racine latérale	Contrôle			1	23.04.09	12h00	24.04.09	2,64	528	50	1,966	37,23	1,86	OK	OK	NON		
76	Pivot	Contrôle			1	23.04.09	12h00	24.04.09	1,02	529	50	3,242	158,92	1,918	OK	OK	NON		
77	Pivot Apex	Contrôle			1	23.04.09	12h00	24.04.09	1,72	530	50	3,491	101,48	1,78	OK	OK	NON		
78	Racine moyenne	Contrôle			1	05.05.09	17h00	06.05.09	1,35	531	50	1,301	48,19	1,63	OK	OK	NON		
79	Racine fine	Contrôle			1	05.05.09	17h00	06.05.09	1,4	532	50	2,504	89,43	1,803	OK	OK	NON		
80	Racine fine apex	Contrôle			1	05.05.09	17h00	06.05.09	0,09	533	50	0,031	17,22	-3,6	OK	OK	NON		
81	Racine extra-fine	Contrôle			1	05.05.09	17h00	06.05.09	0,39	534	50	1,051	134,74	1,623	OK	OK	NON		
82	Feuille	Contrôle			1	05.05.09	17h00	06.05.09	1,72	535	100	5,474	318,26	1,429	OK	OK	NON		
83	Ecorce	Contrôle			1	05.05.09	17h00	06.05.09	1,29	536	100	1,381	107,05	1,732	OK	OK	NON		

Annexe 7. Profils électrophorèse en gel à 1,5% des ARN isolés à partir de différents organes (feuille, écorce, racine) sous différents traitements (blessure, l'éthylène, et stress hydrique) des somaplants de 1 an issus de l'embryogenèse somatique

