



**Master Biologie, Géosciences, Agronomie, Environnement**  
**Spécialité : Biologie & Evolution des Plantes**

**Parcours : Biologie Fonctionnelle des Plantes**

**Année Universitaire : 2009-2010**

**CARTOGRAPHIE SPATIALE DE L'EXPRESSION GENIQUE DANS DIFFERENTS  
TYPES DES RACINES EN REPOSE A UN DEFICIT HYDRIQUE CHEZ *Hevea  
brasiliensis***

**Riza-Arief PUTRANTO**

**Equipe Biologie Cellulaire de la Réponse aux Stress abiotiques et biotiques  
chez les espèces pérennes Tropicales (BURST)  
UMR Développement et Amélioration des Plantes (DAP)  
CIRAD**

Soutenu le 18 juin 2010

**CIRAD-DIST  
Unité bibliothèque  
Lavalette**





## RESUME

Les racines jouent un rôle dans la stabilité de la plante, mais aussi dans l'absorption et le transport de l'eau et des éléments minéraux. Lors d'un stress hydrique, elles sont affectées et servent comme organes de perception de signaux. Pourtant, le développement d'un système racinaire est spécifique chez les espèces dicotylédones pérennes, par rapport à celles de modèle connues. Certaines études ont été réalisées chez quelques espèces pérennes au niveau moléculaire afin d'identifier les gènes potentiels impliqués dans le stress hydrique. Cependant, les véritables connaissances sur les différents types de racines dans un système racinaire sont toujours manquantes. L'objectif de cette étude est donc de créer une cartographie spatiale de l'expression génique de collection des gènes disponibles dans les différents types de racines chez une espèce dicotylédone pérenne (*Hevea brasiliensis*) en réponse à un déficit hydrique par une approche de RT-PCR en temps réel. Premièrement, en s'appuyant de la base de données d'EST des racines d'hévéa contenant 50146 contigs, sept gènes ayant une forte homologie avec des gènes impliqués dans le développement racinaire ont pu être identifiés. Ces gènes ont été ajoutés à une collection de gènes cibles chez l'hévéa. Deuxièmement, sur la base des 48 gènes cibles de cette collection, l'ensemble de notre résultat a montré que la régulation spatiale de ces gènes est exacerbée par le déficit hydrique modéré ( $FTSW=0,4$ ) (13 gènes chez les plantes témoins contre 22 chez les plantes traitées) dans de différents organes étudiés. Les niveaux d'abondance relative des transcrits en réponse au déficit hydrique varient significativement au sein d'un même organe pour moins de gènes (10 gènes). Au niveau des organes racinaires, les racines extra-fines sont révélées comme organe très sensible au déficit hydrique.

**Mots clés :** *Hevea brasiliensis*, cartographie spatiale, expression génique, déficit hydrique, RT-PCR en temps réel, racines.

Roots play a role in plant stability, but also in the absorption and transport of water and mineral elements. During a water stress, they are affected and serve as signaling perception organs. However, the development of a root system is specific in dicotyledonous perennial species to the known plant models. Some studies have been performed in some perennial species at the molecular level in order to identify potential genes involved in water stress. On the other hand, the real information about stress molecular responses in the different types of roots is still missing. The objective of this study is to create a spatial mapping of expression of genes collection available in different types of roots in a dicotyledonous perennial species (*Hevea brasiliensis*) in response to a water deficit by real time RT-PCR. Firstly, using a root EST database containing 50146 contigs, seven genes with a high homology with genes involved in root development were identified. These genes have completed the collection of target genes identified in rubber tree. Secondly, between 48 studied genes, our result showed that spatial regulation of these genes is exacerbated by the moderate water deficit ( $FTSW=0,4$ ) (13 genes in plants witnesses against 22 in treated plants) in different organs. However, there are few significant effects on the levels of transcript relative abundance in response to the water deficit (10 genes). In root tissues, extra-small roots are revealed as very sensitive to water deficit.

**Keywords:** *Hevea brasiliensis*, spatial mapping, gene expression, water stress, real-time RT-PCR, roots.

20 AOÛT 2010



# 1 Introduction

## 1.1 Contexte général

*Hevea brasiliensis* (Mull- 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, en particulier dans des régions à régime climatique sub-tropical, l'hévéa est un arbre dont est extrait l'hydrocarbure « caoutchouc », un polyisoprène à haut poids moléculaire présent dans le latex et caractérisé par des qualités élastiques et de résistance à l'échauffement remarquables lui conférant de nombreux usages industriels.

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 recherche (UR) dont certaines sont communes à plusieurs institutions de recherche et de formation agronomique, dites « Unité Mixte de Recherche » (UMR).

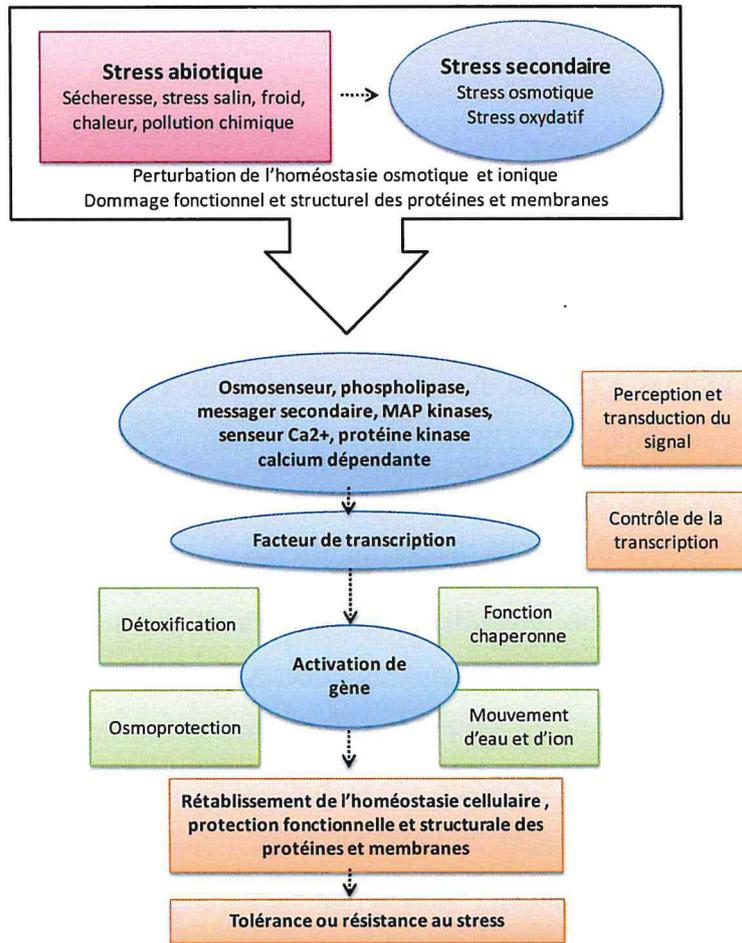
Mon projet a été réalisé dans l'équipe Biologie Cellulaire de la Réponse aux Stress abiotiques et biotiques chez les espèces pérennes Tropicales (BURST) de l'UMR Développement et Amélioration des Plantes (DAP), une des unités du Département BIOS du Cirad.

## 1.2 Contexte scientifique

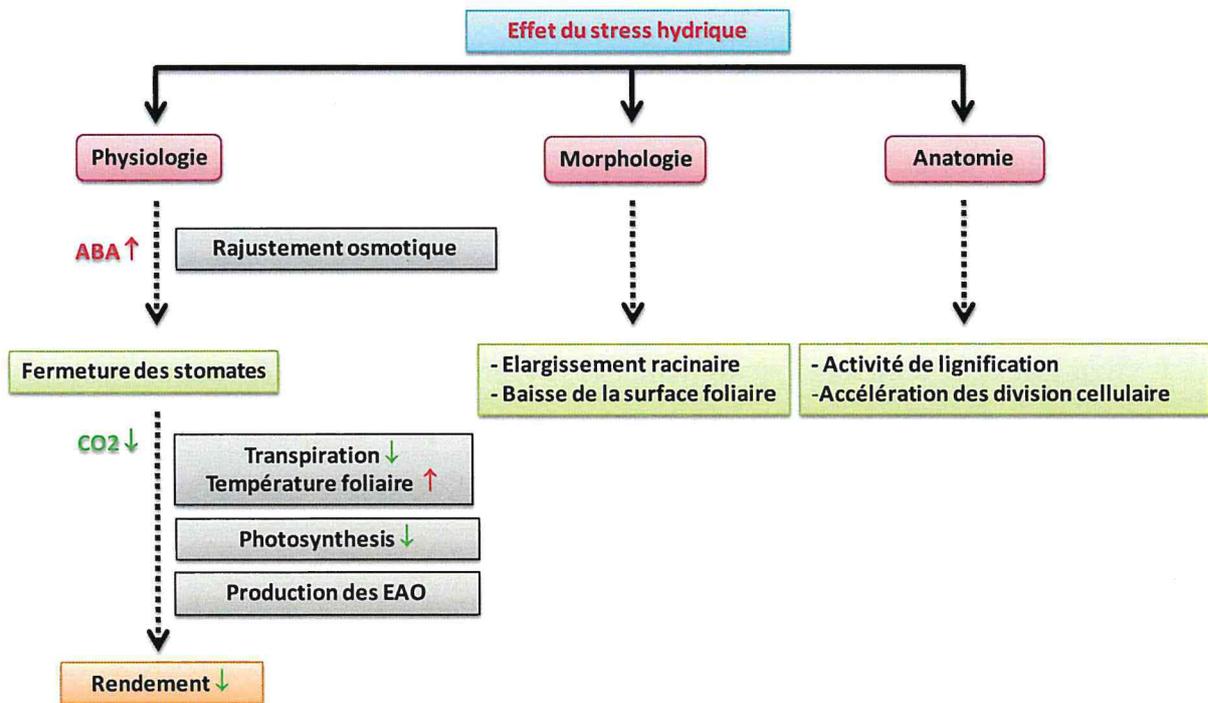
### 1.2.1 Réponse des plantes aux stress hydriques et mécanismes de tolérance

La croissance de la plante est largement affectée par les contraintes abiotiques environnementales telles que les stress hydriques, etc. Ces contraintes induisent diverses réponses au niveau de la plante.

Des mécanismes d'adaptation des plantes au déficit hydrique ainsi qu'à la sécheresse ont été rapportés. Il s'agit des mécanismes d'esquive, d'évitement et de tolérance (Annerose, 1991). Les mécanismes de réponses au stress peuvent être classés en trois étapes : (1) perception et transduction du signal, (2) modification de l'expression des gènes et (3) activation des



**Figure 1.** Représentation schématique de la cascade d'événements impliqués dans la réponse aux stress abiotiques (d'après Vinocur et Altman, 2005)



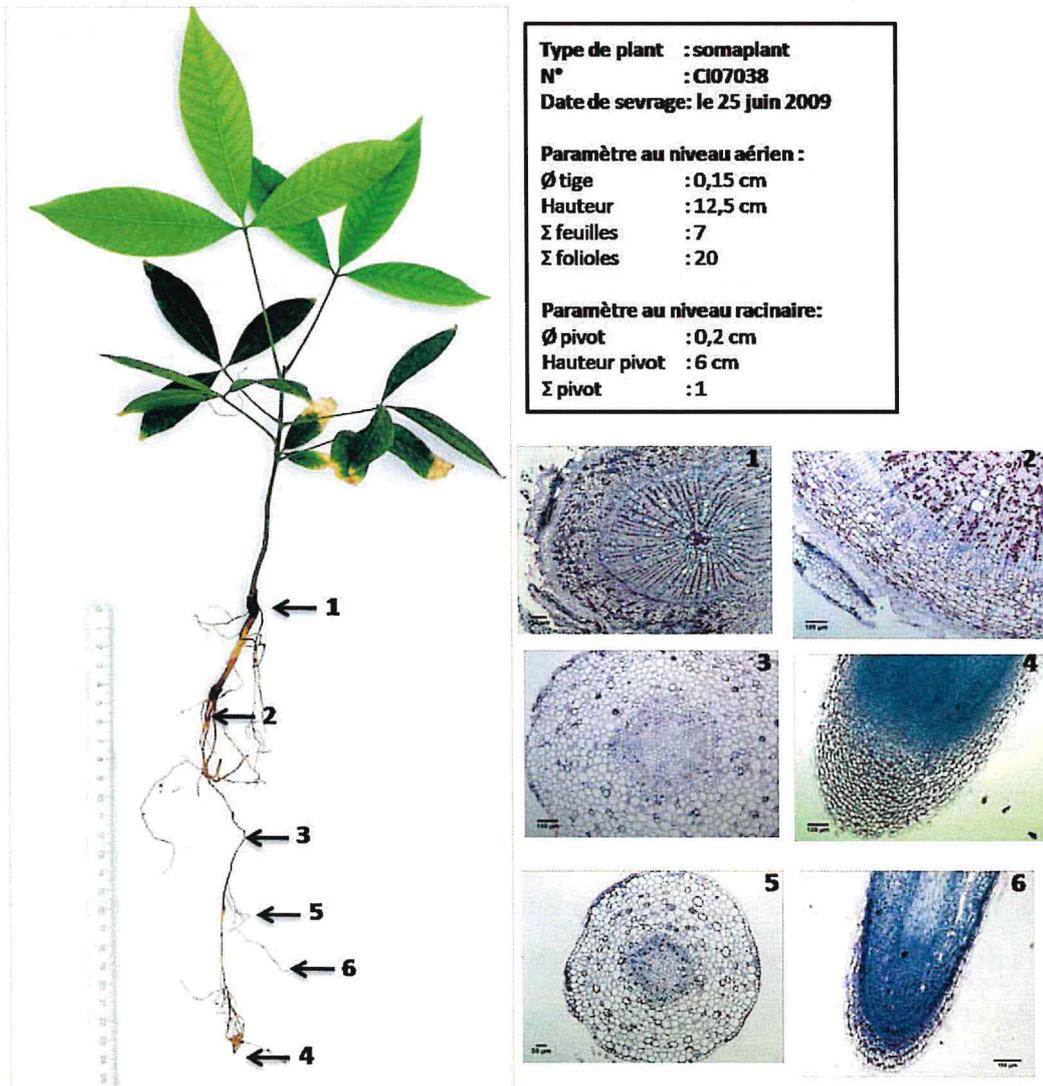
**Figure 2.** Représentation schématique de la cascade d'événements dans de différents niveaux chez les plants sous un stress hydrique (d'après Schachtman, 2008)

mécanismes de réponse au stress (**Figure 1**) (Vinocur et Altman, 2005) et agissent au niveau physiologique, morphologique et anatomique (**Figure 2**). Des caractères liés à l'adaptation au stress hydrique comme la croissance racinaire, l'accumulation des réserves, l'osmorégulation, l'efficacité d'utilisation de l'eau, la conductance stomatique, le transfert d'électrons dans le système photosynthétique, la régulation des activités enzymatiques ont été largement étudiés (Champoux *et al.*, 1995 ; Callaway et Mahall, 1996 ; Huang et Duncan, 1996 ; Devakumar *et al.*, 1999 ; DaMatta et Ramalho, 2006 ; Bae *et al.*, 2008).

Au niveau morphologique, l'expansion foliaire dépend de la pression de turgescence qui est réduite en premier lieu par le déficit hydrique. Donc, la réduction de la surface foliaire est une première ligne de défense contre la sécheresse, suivie par un développement du système racinaire. Dans les racines, l'ajustement osmotique contribue à maintenir l'activité des apex et la croissance racinaire vers des zones humides (Schachtman et Goodger, 2008). En même temps, les plantes se protègent au niveau anatomique par l'activité de lignification et de divisions cellulaires.

Les analyses moléculaires ont démontré l'existence de régulation dépendante et indépendante de l'acide abscissique (ABA) dans les réseaux des gènes sous condition de déficit hydrique (Yamaguchi-Shinozaki et Shinozaki, 2005 ; 2006). Au niveau physiologique, lors qu'il y a une induction par stress, un mécanisme de synthèse de l'ABA au niveau racinaire accompagné par l'ajustement osmotique et sert comme signalisation à distance (Shinozaki et Yamaguchi-Shinozaki, 2007). Ceci affecte la fermeture stomatique qui déclenche trois mécanismes tels que la baisse de taux de transpiration et de photosynthèse, la production des espèces activées de l'oxygène (EAO) (Yamaguchi-Shinozaki et Shinozaki, 2005 ; Schachtman et Goodger, 2008), qui a pour conséquence la réduction du rendement.

Plusieurs centaines de gènes ont été identifiés et répondent à ces contraintes au niveau transcriptionnel (Kreps *et al.*, 2002 ; Seki *et al.*, 2002 ; Xiong *et al.*, 2002 ; Zhu, 2002 ; Shinozaki et Yamaguchi-Shinozaki, 2007 ). Il est important d'analyser les fonctions des protéines issus de ces gènes induits pas seulement pour comprendre les mécanismes moléculaires de la tolérance du stress et les réactions des plantes supérieures, mais aussi pour l'amélioration de la tolérance de stress des cultures cultivées par recombinaison ou par transgénèse. Quelques gènes induits par les stress ont déjà été utilisés pour améliorer la tolérance de stress des plantes transgéniques (Thomashow, 1999 ; Hasegawa *et al.*, 2000 ; Zhang, 2003 ; Umezawa *et al.*, 2006).



**Figure 3.** Description histologique de différents types des racines chez les somaplants d'hévéa âgés de 1 an. (1) collet (Ø trans.), (2) racine moyenne différenciée ( $\phi > 2$  mm, Ø long.), (3) racine fine différenciée ( $\phi$  1-2 mm, Ø trans.), (4) racine fine apex (Ø long.), (5) racine extra-fine différenciée ( $\phi < 1$  mm, Ø trans.), (6) racine extra – fine apex (Ø long.) (d'après Putranto, 2009).

### 1.2.2 Etat des connaissances sur le développement racinaire

Les racines jouent un rôle dans la stabilité de la plante, mais aussi dans l'absorption et le transport de l'eau et des éléments minéraux (Jourdan, 1995). La littérature est principalement axée sur trois modèles architecturaux et fonctionnels. Le système racinaire pivotant des espèces dicotylédones est décrit chez *Arabidopsis thaliana*, alors que le système fasciculé des espèces monocotylédones est principalement étudié chez *Oryza sativa*. Enfin, un troisième modèle a été développé chez *Medicago truncatula* pour les systèmes racinaires du type pivotant en symbiose avec les nodules fixateurs d'azote. Le système racinaire du type pivotant d'*Arabidopsis thaliana* représente un véritable modèle pour les dicotylédones. Ce système est constitué d'un pivot central à partir duquel les racines latérales (primaires, secondaires, tertiaires, ...) se repartissent.

Le système racinaire pivotant d'*Arabidopsis* est régulé au niveau de la racine latérale, des poils absorbants et de la coiffe. Des gènes spécifiques et des miRs sont impliqués dans la régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle au cours du développement et en réponse aux stress abiotiques (Birnbaum *et al.*, 2003 ; Guo *et al.*, 2005 ; Wang *et al.*, 2005 ; Zhao *et al.*, 2007 ; Boualem *et al.*, 2008 ; Ubeda-Tomas *et al.*, 2008 ; Gutierrez *et al.*, 2009 ; Harberd *et al.*, 2009 ; Laporte, 2009 ; Ubeda-Tomás *et al.*, 2009). Parmi le millier de gènes identifiés, des fonctions spécifiques ont été mises en évidence (Montiel *et al.*, 2004). Par exemple, les gènes *SLR1*, *IAA28*, *KNAT6* et *ANR1* régulent directement le développement de la racine latérale en interagissant avec des phytohormones (IAA, CK, etc) et des nutriments (N, P, S, etc).

En contraste, chez les espèces pérennes, il n'y a pas beaucoup de cas d'étude sur les expressions géniques au niveau racinaire par rapport à ce qui est connu chez les espèces modèles. Quelques gènes, tels que les *ARRO1* et *ARL1* chez le pommier, le *PRP1* et *PRP2* chez la vigne, ont été identifiés et leur rôle dans le développement des racines adventives étant mise en évidence (Thomas *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2009 ; Smolka, 2009 ; Smolka *et al.*, 2009).

### 1.2.3 Spécificité des systèmes racinaires des espèces pérennes dicotylédones

Le développement et l'adaptation du système racinaire des espèces pérennes posent de nouvelles questions biologiques. Outre son rôle dans l'ancrage (Coutts, 1983), le système racinaire participe également au stockage des assimilats (Fitter, 1991). La capacité de stockage de réserves est une composante importante et originale des espèces arborescentes

**Tableau 1.** Récapitulatif des gènes étudiés pour l'analyse de transcrit contre le déficit hydrique dans les différents types des racines chez les somaplants de 7 mois.

| N°  | Gène | Amorces   | Séquence des amorces                     | Callbrateur   | Efficacité PCR  | Annotation sur BLAST | Homologie (%)                            | Espèce | Taille de produit PCR (pb)  |     |
|---|------|-----------|--|---|-----------------|----------------------|--|--------|-----------------------------|-----|
| 0   | GA   | Actine    | HbActin-F11<br>HbActin-R205              | AGTGTGATGGATATCAGG<br>GGGATGCAAGGATAGATC              | 10 <sup>3</sup> | 1,953                | HbActine 6-1                             | 100    | <i>Hevea brasiliensis</i>   | 195 |
| <b>Biosynthèse de l'éthylène</b>  |      |           |  |   |                 |                      |  |        |                             |     |
| 1   | G8   | SAMS      | HbSAM-F1<br>HbSAM-R243                   | CACCAATGGCATAGGAGAC<br>ACCTTAACCCGTCAGGGC             | 10 <sup>3</sup> | 1,87                 | HbSAM                                    | 100    | <i>Hevea brasiliensis</i>   | 244 |
| 2   | G9   | ACSI      | HbACSIbis-F1581<br>HbACSIbis-R1760       | GATCAATGATGGAAAGACCC<br>CCAAAACGGGTGATCTGT            | 10 <sup>4</sup> | 2,101                | HbAcsD10ADNcFlreconstruction             | 100    | <i>Hevea brasiliensis</i>   | 180 |
| 3   | G10  | ACSF3     | HbACSF3-F306<br>HbACSF3-R495             | TCCTCACTCCCGTGTGT<br>CTTGCTAGTTGCTACGCATA             | 10 <sup>3</sup> | 2,21                 | HbACSF3-S1Rae                            | 100    | <i>Hevea brasiliensis</i>   | 190 |
| 4   | G11  | ACSF10    | HbACSF10-F311<br>HbACSF10-R490           | CAAGCCAGAAATGAGCATG<br>CGTGTCTTTTATGTTGC              | 10 <sup>3</sup> | 1,857                | HbACSF10-S1Race                          | 100    | <i>Hevea brasiliensis</i>   | 180 |
| 5   | G12  | ACO1      | HbACO1bis-F904<br>HbACO1-R1060           | TGCAGGCCTCAAGTTCCAA<br>CTTCATCAATCAATGCGGCT           | 10 <sup>4</sup> | 1,945                | HbAcoH5ADNcCloneKSR4FL                   | 100    | <i>Hevea brasiliensis</i>   | 157 |
| 6   | G13  | ACO2      | HbACO2bis-F877<br>HbACO2bis-R1099        | CAGACCAAGCTTTGG<br>ACACTCCAAATATTCCTCTC               | 10 <sup>3</sup> | 1,975                | HbAcoH4ADNcClone1(clone12)FL             | 100    | <i>Hevea brasiliensis</i>   | 223 |
| 7   | G14  | ACO3      | HbACO3-F1141<br>HbACO3-R1338             | CAGAAAGAGCTGGTGTAC<br>CAACAACCTCAATCTCTCT             | 10 <sup>4</sup> | 2,072                | HbAcoO4ADNcClone2FL                      | 100    | <i>Hevea brasiliensis</i>   | 198 |
| <b>Signalisation de l'éthylène, de l'acide jasmonique, et autres</b>                |      |           |  |   |                 |                      |  |        |                             |     |
| 8   | G35  | ETR1      | HbETR1<br>HbETR1                         | GGTAATGCTGCAAGTTTCAC<br>GGGCTGAGTGAATTTAGT            | 10 <sup>3</sup> | 2                    | Ethylene receptor 1                      | 86     | <i>Populus trichocarpa</i>  | 202 |
| 9   | G36  | ETR2      | HbETR2<br>HbETR2                         | TGCCCTGACATCAAGTGGT<br>TCAGACCCCAAAACCGAAG            | 10 <sup>3</sup> | 1,984                | Ethylene receptor 2                      | 78     | <i>Populus trichocarpa</i>  | 208 |
| 10  | G29  | EIN3      | HbEIN3<br>HbEIN3                         | CAATGTCCTTACAGCCAAC<br>AGTTCCACATCGGGACAG             | 10 <sup>4</sup> | 1,09                 | Ethylene insensitive 3                   | 86     | <i>Ricinus communis</i>     | 194 |
| 11  | G30  | EIN2      | HbEIN2<br>HbEIN2                         | TGGCCATATCTTCCGCAAAAG<br>GCCCTATATTTACCCAGTTGAG       | 10 <sup>3</sup> | 1,902                | Ethylene insensitive protein 2           | 88     | <i>Populus trichocarpa</i>  | 210 |
| 12  | G32  | MAPK      | HbMAPK<br>HbMAPK                         | GCCAAAGTTGAGCGATAGT<br>ACCAACTTCAAAATCCGCG            | 10 <sup>4</sup> | 1,912                | Mitogen-activated protein kinase         | 80     | <i>Gossypium hirsutum</i>   | 194 |
| 13  | G46  | CIPK      | HbCIPK<br>HbCIPK                         | GACGGGTGAATGATCTCT<br>GTGACCATCTTGTCTCT               | 10 <sup>3</sup> | 1,988                | CBL-interacting protein kinase           | 84     | <i>Populus trichocarpa</i>  | 188 |
| 14  | G33  | ERF BIVb2 | HbERF-BIVb2 F2 778<br>HbERF-BIVb2 R2 993 | CGGAAGTTGTGTCAGATGAA<br>TGTAACATCTTCCCGCTCT           | 10 <sup>7</sup> | 2,106                | DREB protein 2C, putative                | 79     | <i>Ricinus communis</i>     | 216 |
| 15  | G34  | ERF Rla   | HbERF-RLA F2 315<br>HbERF-RLA R2 522     | CTTATGATCGGAGGGCTTC<br>GGTGGTGGTGCATAATTTTC           | 10 <sup>7</sup> | 2,225                | AP2/ERF domain transcription factor      | 76     | <i>Populus trichocarpa</i>  | 202 |
| 16  | G37  | SAUR      | HbSAUR<br>HbSAUR                         | GGTGAGGAGCAACAGAGTT<br>AGATGGTGTGGTGGTGGT             | 10 <sup>3</sup> | 1,975                | Auxin responsive SAUR protein            | 88     | <i>Populus trichocarpa</i>  | 200 |
| 17  | G38  | COI1      | HbCOI1<br>HbCOI1                         | ACATCAAGCAGAGACCCGAACG<br>TCATCGGGACAGGTTGAAGT        | 10 <sup>3</sup> | 1,927                | Coronatine insensitive protein 1         | 82     | <i>Populus trichocarpa</i>  | 200 |
| 18  | G39  | WRKY      | HbWRKY<br>HbWRKY                         | TCAGTCAAAATTCACCGAATC<br>GCAAATTCATCTGATCACTCCC       | 10 <sup>3</sup> | 1,885                | DNA-binding WRKY                         | 90     | <i>Ricinus communis</i>     | 200 |
| 19  | G27  | WRKY-col  | HbWRKY-col<br>HbWRKY-col                 | CCAAGCTCCGCTGTCAG<br>AGCTCTCATAGGGGTGCGAG             | 10 <sup>4</sup> | 2                    | WRKY col-1                               | 90     | <i>Ricinus communis</i>     | 200 |
| 20  | G40  | MYB       | HbMYB<br>HbMYB                           | TAGCAAGTCTTCTCACTGC<br>TCCAACAAGATCACAAT              | 10 <sup>4</sup> | 2                    | Myb superfamily                          | 87     | <i>Populus trichocarpa</i>  | 183 |
| 21  | G24  | SAP1      | HbSAP1-F673<br>HbSAP1-R908               | GTGGAGTCAAATAGCATCTGTGTC<br>AGCCTCAGTGCCCGCATG        | 10 <sup>4</sup> | 2,199                | SAP1                                     | 100    | <i>Hevea brasiliensis</i>   | 235 |
| 22  | G25  | SAP2      | HbSAP2bis-F641<br>HbSAP2bis-R900         | GTCCAGCTGCATGATTTCTGTTTC<br>GCCCATAGCCTTAAATTCGAAGGTG | 10 <sup>7</sup> | 1,85                 | SAP2                                     | 100    | <i>Hevea brasiliensis</i>   | 259 |
| 23  | G26  | SAP3      | HbSAP3bis-F641<br>HbSAP3bis-R900         | TTCCAGCCGCTCTGTCTTCTTTTG<br>TGCCCATAGCCTTAAATTCGAAGC  | 10 <sup>4</sup> | 2                    | SAP3                                     | 100    | <i>Hevea brasiliensis</i>   | 259 |
| <b>Développement racinaire</b>  |      |           |  |   |                 |                      |  |        |                             |     |
| 24  | G1   | IAA/SHY   | HbIAA F 539<br>HbIAA R 718               | TGGATGCTGTGGTGTGATG<br>CATCATTTGCCAGACAGTG            | 10 <sup>7</sup> | 2,366                | Auxin-responsive protein IAA27, putative | 81     | <i>Ricinus communis</i>     | 180 |
| 25  | G2   | HB8       | HbHB8 F 1335<br>HbHB8 R 1515             | AGTGGGCTGCAACAATC<br>TATAGCCATGGCAACCCCTCT            | 10 <sup>7</sup> | 1,606                | DNA binding protein, putative            | 91     | <i>Ricinus communis</i>     | 181 |
| 26  | G3   | SLR       | HbSLR F2 823<br>HbSLR R2 1036            | ATTGGACTTGCAACAAGAGC<br>CCACCTTAAAGACAGAGACACA        | 10 <sup>7</sup> | 2                    | Auxin-responsive protein IAA7, putative  | 66     | <i>Populus trichocarpa</i>  | 216 |
| 27  | G4   | TIR1      | HbTIR1 F 474<br>HbTIR1 R 693             | CGCCTTCACTGTCAGGCTCT<br>CATTGTCTCCAGCTTTGCGAG         | 10 <sup>3</sup> | 2,069                | Transport inhibitor response 1, putative | 88     | <i>Ricinus communis</i>     | 220 |
| 28  | G5   | SHR       | HbSHR F 1077<br>HbSHR R 1298             | TTGTAAGGGTTTCCAAAGA<br>AACAGTGCTAACCCACATGC           | 10 <sup>7</sup> | 1,987                | Shoot root protein, putative             | 57     | <i>Arabidopsis thaliana</i> | 222 |
| 29  | G6   | RGA       | HbRGA F 380<br>HbRGA R 579               | GAAATTCGCCATTTCCACAG<br>AAGCATCGGTGTGTTAGGC           | 10 <sup>7</sup> | 2,01                 | DELLA protein GAI, putative              | 91     | <i>Ricinus communis</i>     | 200 |
| 30  | G7   | RAV1      | HbRAV1 F5 144<br>HbRAV1 R5 340           | TTAGGCAAGTCTGGAGGTT<br>ACCCCACTGCTGCTGTATC            | 10 <sup>7</sup> | 2,085                | RAV1 transcription factor, putative      | 67     | <i>Ricinus communis</i>     | 197 |
| <b>Défense par les systèmes de détoxification des espèces activées de l'oxygène</b> |      |           |  |   |                 |                      |  |        |                             |     |
| 31  | G16  | CuZnSOD   | HbCuZnSOD<br>HbCuZnSOD                   | AGACACAACAATGGCTGC<br>TGAGTGAAGGCTTGTAAAC             | 10 <sup>3</sup> | 1,899                | CuZnSOD                                  | 100    | <i>Hevea brasiliensis</i>   | 200 |
| 32  | G17  | MnSOD     | HbMnSOD<br>HbMnSOD                       | CTTGGACAAGAATTGAAGAAGC<br>ATACACTTCACTTGCATCTTCC      | 10 <sup>3</sup> | 1,717                | MnSOD                                    | 100    | <i>Hevea brasiliensis</i>   | 202 |
| 33  | G18  | CAT       | HbCAT<br>HbCAT                           | TATAGATCTGGGACCTG<br>GGTGGCATCTCTCAAATG               | 10 <sup>4</sup> | 2,057                | Catalase                                 | 100    | <i>Hevea brasiliensis</i>   | 190 |
| 34  | G21  | APX1      | HbAPX1<br>HbAPX1                         | TTACCGATCTGCTTCC<br>CCATCAACAACCAACAC                 | 10 <sup>4</sup> | 1,913                | APX1 Protein                             | 100    | <i>Hevea brasiliensis</i>   | 218 |
| 35  | G22  | APX2      | HbAPX2<br>HbAPX2                         | TTACCGATCTGCTTCC<br>ATCAACCAACCACTGCC                 | 10 <sup>3</sup> | 1,92                 | APX2 Protein                             | 98     | <i>Hevea brasiliensis</i>   | 222 |
| 36  | G23  | MDHAR     | HbMDHAR<br>HbMDHAR                       | AGCCCGGAAAAATATGGTGGC<br>TTCAAGTTGCCAGATCTATCCAG      | 10 <sup>4</sup> | 1,86                 | MDAR Protein                             | 90     | <i>Ricinus communis</i>     | 113 |
| 37  | G19  | GCcyto    | HbGCcyto<br>HbGCcyto                     | CAAGGAAATGGGTCTTIG<br>TCCAATAATCAATGCGAG              | 10 <sup>3</sup> | 1,816                | GCL cytoplasmic protein                  | 100    | <i>Hevea brasiliensis</i>   | 202 |
| 38  | G20  | GCLchloro | HbGCLchloro<br>HbGCLchloro               | ACTCCTGAAGAACAATAAGCTG<br>GCCTCAGCAATCTAATCACTTAATAG  | 10 <sup>7</sup> | 1,9                  | GCL chloroplastic protein                | 100    | <i>Hevea brasiliensis</i>   | 294 |
| 39  | G28  | OASTL     | Hbysteinesyn-F337<br>Hbysteinesyn-R526   | CATCAAGCCGGTGAAGGTGTC<br>CATGCCCTTGTGGATCAG           | 10 <sup>7</sup> | 1,94                 | Cystéine synthétase-coll                 | 90     | <i>Ricinus communis</i>     | 208 |
| <b>Autres gènes impliqués dans le métabolisme</b>                                   |      |           |  |   |                 |                      |  |        |                             |     |
| 40  | G41  | ACR       | HbACR<br>HbACR                           | TGTGAAGGACTAGTTGAAC<br>CCATGCCAGGAATATGTG             | 10 <sup>4</sup> | 1,972                | Acyl CoA reductase                       | 100    | <i>Hevea brasiliensis</i>   | 186 |
| 41  | G42  | ACBP      | HbACBP<br>HbACBP                         | GTTTAAATGAGGGACAGAG<br>TTTGAACAACAAGGAACCT            | 10 <sup>3</sup> | 1,872                | Acyl-CoA-binding protein                 | 90     | <i>Jatropha curcas</i>      | 180 |
| 42  | G43  | CaM       | HbCaM<br>HbCaM                           | TGAGGAGGTTGATGAGATG<br>TGAAGATACCTCACAGCG             | 10 <sup>4</sup> | 1,946                | Calmodulin                               | 81     | <i>Populus tomentosa</i>    | 200 |
| 43  | G44  | CAS1      | HbCAS1<br>HbCAS1                         | CACGAGGCTGCTATCCAC<br>TCCCTGATCTTTGAGCA               | 10 <sup>7</sup> | 1,977                | Latex beta-cyanoalanine synthase         | 100    | <i>Hevea brasiliensis</i>   | 194 |
| 44  | G45  | CAS2      | HbCAS2<br>HbCAS2                         | CTCTGTATGCAATATTTGT<br>GCCAAACATCTTTGAAAC             | 10 <sup>4</sup> | 1,99                 | Phloem beta-cyanoalanine synthase        | 100    | <i>Hevea brasiliensis</i>   | 181 |
| 45  | G15  | CAS3      | HbCAS-F1186<br>HbCAS-R1368               | TAAAGTCTTTGGATGGG<br>GGGTGAAGTGAAGTGTGATG             | 10 <sup>3</sup> | 2,078                | HbCASlatex                               | 100    | <i>Hevea brasiliensis</i>   | 183 |
| 46  | G47  | GS        | HbGS<br>HbGS                             | TTGCAGAAACCAATCTGTG<br>AAGGGCAACTGGCGAAACA            | 10 <sup>3</sup> | 1,957                | Glutamine synthetase                     | 97     | <i>Hevea brasiliensis</i>   | 195 |
| 47  | G48  | LTPP      | HbLTPP<br>HbLTPP                         | CCTTCAAGATCAGCCTG<br>AGGTAAAGAAAGGAGCC                | 10 <sup>4</sup> | 1,867                | Lipid transfer precursor protein         | 100    | <i>Hevea brasiliensis</i>   | 180 |
| 48  | G31  | Ubi       | HbUbi<br>HbUbi                           | CTGGAAAGACAATCACTGG<br>TTCGAATACACACCCG               | 10 <sup>3</sup> | 1,819                | Ubiquitin                                | 99     | <i>Hevea brasiliensis</i>   | 214 |

dicotylédones. De plus, la durée de vie des systèmes racinaires implique une adaptation incessante aux conditions édaphiques locales et à leur variation influencée par les contraintes biotiques et abiotiques.

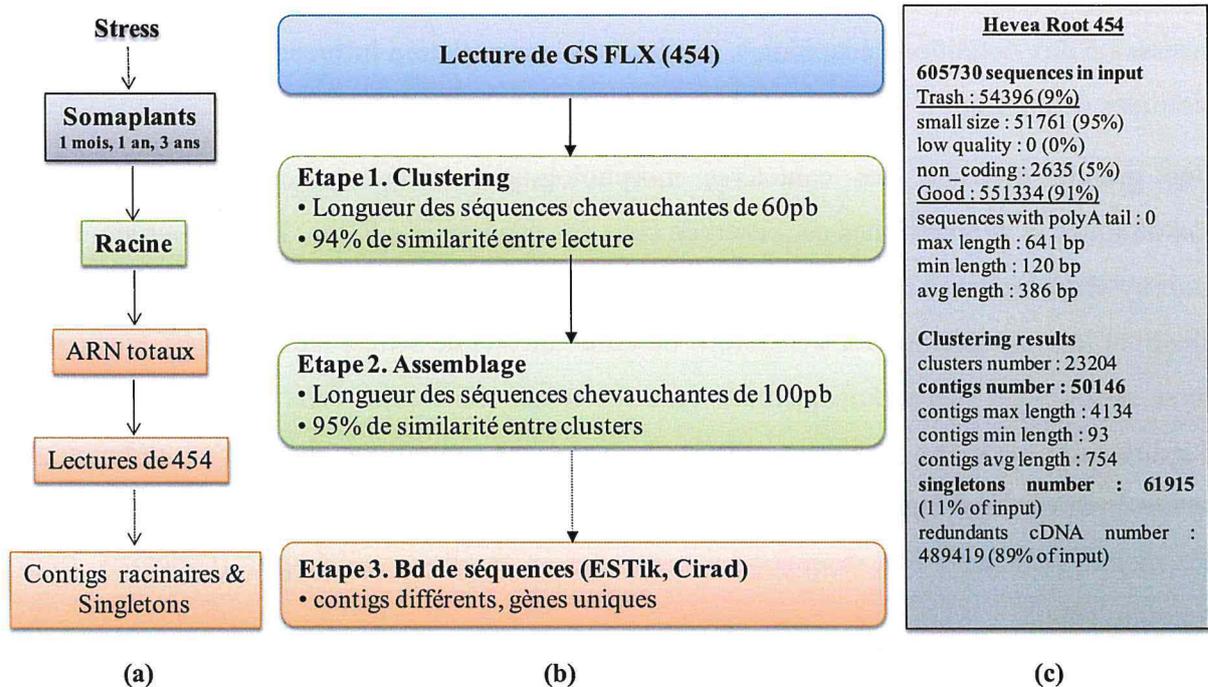
Une grande diversité des caractères morphologiques, morphogénétiques, géotropiques, anatomiques et géométriques est observée chez ces espèces (Le Roux, 1994 ; Jourdan, 1995). Leur système racinaire est composé de deux axes du développement profond et superficiel qui illustrent leur complexité. La dynamique de croissance et de sénescence racinaire leur permet de se développer bien spécifiquement dans des zones différentes dans le sol afin de définir l'architecture racinaire (Jourdan, 1995). Lorsque les conditions deviennent défavorables (stress hydrique, sol compacté,...), les apex des racines peuvent se nécroser et la croissance des racines peut ainsi être stoppée puis reprendre en amont par réitération (Oldeman, 1974 ; Jourdan, 1995).

L'hévéa est une espèce arborescente à croissance rapide et rythmique dont le système racinaire a fait l'objet de nombreux travaux à partir de semis et de microboutures (Le Roux, 1994 ; Le Roux et Pagès, 1994 ; Le Roux et Pages, 1996 ; Carron *et al.*, 2000). Lors d'une étude morphologique précédente chez les somaplants âgés de 1 an, les racines ont été classées en quatre catégories en fonction de leur diamètre : 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 (Putranto, 2009) (**Figure 3**).

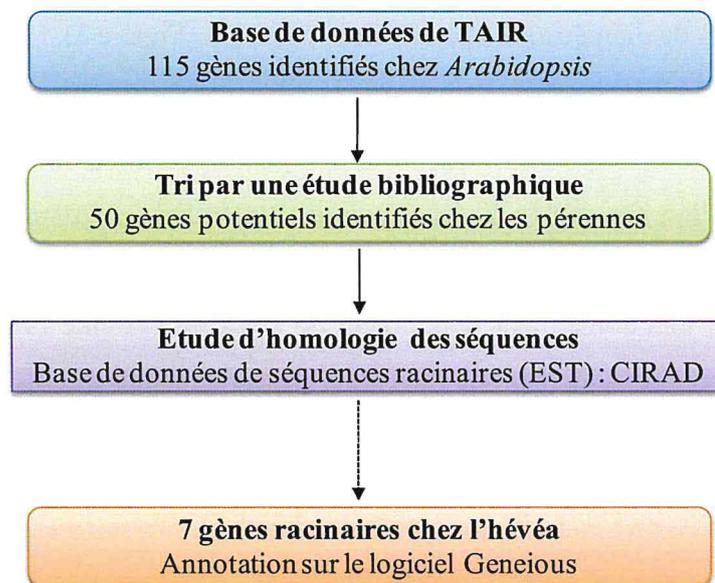
Certaines études ont été réalisées chez quelques espèces pérennes (peuplier, pommier, pin, vigne...) au niveau moléculaire afin d'identifier les gènes potentiels impliqués dans le stress hydrique (Dubos et Plomion, 2001 ; El-Khatib *et al.*, 2004 ; Brosché *et al.*, 2005). Cependant, la plupart des études se font préférentiellement sur les feuilles et ne nous donnent pas une description claire du fonctionnement notamment de celui du système racinaire. Donc, il est intéressant d'analyser spécifiquement de différents types de racines afin de mieux comprendre leur fonctionnalité face à un déficit hydrique (Vadez *et al.*, 2007).

#### 1.2.4 Développement de clones de porte-greffe chez l'hévéa

Les plantations actuelles d'hévéas sont constituées de clones greffés sur des porte-greffes issus de semis non sélectionnés. Le clonage du système racinaire est supposé apporter une amélioration sans précédent du matériel végétal. A ce jour, les techniques de multiplication *in vitro* permettent de disposer de nouveaux types variétaux chez l'hévéa dont les clones franc-de-pied produits par embryogenèse somatique.



**Figure 4.** Construction de base de données de séquences racinaires (EST) chez *Hevea brasiliensis*. (a) Schéma de préparation de base de données de séquences (EST) racinaires. (b) Les étapes de construction d'une base de données de séquences par une méthode de séquençage de 454 (GS FLX). (c) Récapitulatif de résultats de séquences obtenues.



**Figure 5.** Etapes visant l'identification des gènes potentiellement impliqués dans le développement racinaire chez l'hévéa.

Le clonage de porte-greffes ouvre des perspectives d'amélioration variétale vis-à-vis de la vigueur, de la tolérance à la sécheresse et aux maladies racinaires (Carron *et al.*, 2008 ; Montoro *et al.*, 2008). Une plateforme de micropropagation a été mise en place dans les laboratoires de l'IBRIEC (*Indonesian Biotechnology Research Institute for Estate Crops*) à partir de la technique du Cirad pour produire les microboutures de matériel juvénile issu de semis dans le but de multiplier des clones de porte-greffes (Nurhaimi-Haris *et al.*, 2006 ; Carron *et al.*, 2008). Ce matériel permet d'établir des dispositifs expérimentaux clonaux pour étudier notamment la variabilité génotypique et sa plasticité en réponse aux contraintes édaphiques dont le déficit hydrique.

#### 1.2.5 Description des objectifs et des activités du stage

L'objectif de ce stage est de créer une cartographie spatiale de l'expression génique dans les différents types de racines chez une espèce dicotylédone pérenne (*Hevea brasiliensis*) en réponse à un déficit hydrique afin de poser les premières bases pour une analyse des mécanismes développementaux et de défense mise en place par la plante. Ainsi, la collection de gènes cibles disponibles chez l'hévéa sera enrichie par l'identification de gènes impliqués dans le développement racinaire, et leur expression sera étudiée avant et après déficit hydrique dans les différents types de racines identifiés chez l'hévéa (moyennes, fines différenciées et apex, extra-fines différenciées et apex).

Sur la base d'une étude bibliographique, les gènes impliqués dans le contrôle du développement racinaire seront identifiés dans une base de données de séquences de transcrits racinaires obtenus chez l'hévéa.

Une quarantaine de gènes cibles a été retenue pour cette étude sur la base des gènes étudiés chez l'hévéa et ceux plus spécifiques du développement racinaire (**Tableau 1**). Ces gènes sont impliqués dans : la biosynthèse de l'éthylène (1-7), la signalisation notamment de l'éthylène (ET) et de l'acide jasmonique (JA) (8-23), le développement racinaire (24-30), les systèmes de détoxification des espèces activées de l'oxygène (EAO) (31-39), dans diverses voies métaboliques (40-48).

La régulation de l'expression des gènes cibles a été étudiée par RT-PCR en temps réel en réponse à un déficit hydrique dans les racines moyennes différenciées, les racines fines différenciées et leur apex, et enfin les racines extra-fines différenciées et apex de l'hévéa.

**Tableau 2a.** Données morphologiques des somaplants témoins et traités âgés de 7 mois. T. Température, FTSW. *Fraction of Transpirable Soil Water*, F. Feuille, T. Tige, RM. Racines moyennes, RFD. Racines fines différenciées, RFA. Racines fines apex, RXF. Racines extra-fines.

| Traitement       | Vol de pot (L) | T (°C) | Humidité (%) | Effectifs | FTSW        | Hauteur de tige (cm) | Longueur de racine (cm) | Poids de Matière Fraîche (g) |             |             |             |             |             |
|------------------|----------------|--------|--------------|-----------|-------------|----------------------|-------------------------|------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
|                  |                |        |              |           |             |                      |                         | F                            | T           | RM          | RFD         | RFA         | RXF         |
| Témoin           | 2,5            | 27     | 45           | 3         | 1,00 ± 0,08 | 26,33 ± 9,78         | 33,17 ± 7,59            | 14,05 ± 3,18                 | 9,38 ± 1,93 | 6,86 ± 1,41 | 3,88 ± 0,11 | 0,68 ± 0,09 | 7,85 ± 1,86 |
| Déficit hydrique | 2,5            | 27     | 45           | 3         | 0,40 ± 0,17 | 30,67 ± 5,35         | 33,80 ± 3,60            | 14,21 ± 2,51                 | 8,47 ± 1,35 | 5,51 ± 0,64 | 3,59 ± 0,23 | 0,73 ± 0,08 | 8,41 ± 1,06 |

**Tableau 2b.** Données de rendements d'ARN des somaplants âgés de 7 mois. T. Température, FTSW. *Fraction of Transpirable Soil Water*, PMF. Poids de Matière Fraîche. F. Feuille, T. Tige, RM. Racines moyennes, RFD. Racines fines différenciées, RFA. Racines fines apex, RXF. Racines extra-fines.

| Traitement       | Vol de pot (L) | T (°C) | Humidité (%) | Effectifs | FTSW        | Hauteur de tige (cm) | Longueur de racine (cm) | Rendement d'ARN (µg/gPMF) |              |              |             |                 |              |
|------------------|----------------|--------|--------------|-----------|-------------|----------------------|-------------------------|---------------------------|--------------|--------------|-------------|-----------------|--------------|
|                  |                |        |              |           |             |                      |                         | F                         | T            | RM           | RFD         | RFA             | RXF          |
| Témoin           | 2,5            | 27     | 45           | 3         | 1,00 ± 0,08 | 26,33 ± 9,78         | 33,17 ± 7,59            | 13,55 ± 1,55              | 6,97 ± 2,44  | 11,71 ± 8,33 | 9,00 ± 2,95 | 139,27 ± 130,64 | 6,82 ± 2,50  |
| Déficit hydrique | 2,5            | 27     | 45           | 3         | 0,40 ± 0,17 | 30,67 ± 5,35         | 33,80 ± 3,60            | 15,39 ± 2,57              | 17,11 ± 9,71 | 9,26 ± 1,39  | 9,90 ± 2,24 | 55,48 ± 27,68   | 13,98 ± 3,85 |

## 2 Résultats

### 2.1 Création de la base de données d'Expressed Sequence Tags (EST) d'hévéa

Les séquences des transcrits racinaires ont été réalisées par séquençage 454, puis assemblées et stockées dans la base de données ESTtik. Les ARN totaux de trois types racinaires (racines moyennes, fines, et extra-fines ont été extraits chez des somaplants âgés de 1 mois, 1 an, et 3 ans puis soumis soit à la blessure, à 1 ppm d'éthylène ou à un déficit hydrique d'une *FTSW* atteignant 0,2. Suite à un travail réalisé en stage de Master 1, un mélange proportionnel d'ARN a été envoyé à la société GATC pour séquençage sur une plateforme *GS FLX* (Roche / 454) avec le kit de séquençage *Titanium run*. Il a été obtenu 200 Mb à partir de 500.000 lectures de 400 pb en moyenne pour cet échantillon. Après 2 assemblages successifs, un premier *clustering* des lectures avec un chevauchement de 60 pb ayant 94% d'identité puis un « contigage » plus drastique de lectures issues d'un *cluster* ayant un chevauchement de 100 pb avec 95% d'identité ont été réalisés sur un pipeline d'analyse semi-automatique développé par l'équipe bioinformatique ID de l'UMR DAP (**Figure 4a et b**). Dans cette base de données, 50146 contigs de bonne qualité ont été retenus à partir de 23204 *clusters* (**Figure 4c**). A noter que le nombre élevé de contigs peut refléter une probable contamination avec des ARNs des micro-organismes du sol. Des analyses ultérieures seront menées pour éliminer ces séquences de contaminants éventuels.

### 2.2 Identification des gènes impliqués dans le développement racinaire d'hévéa

Des gènes potentiellement spécifiques des racines ont pu être identifiés dans une liste établie à partir d'une analyse bibliographique et d'une centaine de gènes identifiés dans la base de données de TAIR. Ensuite, en s'appuyant de la base de données d'EST des racines d'hévéa contenant 50146 contigs, sept gènes ayant une forte homologie avec ceux de la liste d'origine ont pu être identifiés (**Figure 5**). Ces gènes impliqués dans le développement racinaire d'hévéa ont été vérifiés et annotés sur le logiciel/base de données Geneious. Le gène *IAA/SHY* est potentiellement impliqué dans le développement de racines secondaires sous le contrôle de l'auxine. Le gène *HB8* code une protéine de liaison à l'ADN et sert de régulateur transcriptionnel. Le gène *SLR* est potentiellement impliqué dans le développement des racines latérales. Le gène *TIR1* régule potentiellement la voie hormonale de l'auxine à travers du développement des racines. Le gène *SHR* est impliqué dans le développement radial des racines au niveau d'apex. Le gène *RGA* régule potentiellement la couche d'endoderme, tandis que le *RAVI* est potentiellement un régulateur transcriptionnel au niveau racinaire.

**Tableau 3.** Comparaison des niveaux d'expression spatiale (au niveau basal) dans de différents organes chez les somaplants témoins âgés de 7 mois. Les lettres démontrent les significativités : **a** (plus forte), **b** (moyenne), **c** (faible), **d** (très faible), **e** (vraiment faible). La boîte en rouge signifie une forte expression ( $\geq 1$ ), en orange signifie une expression assez forte ( $10^{-1} \leq x < 1$ ), en jaune signifie une expression modeste ( $10^{-3} \leq x < 10^{-1}$ ), en vert signifie une expression faible ( $10^{-4} \leq x < 10^{-3}$ ), en vert foncé signifie une expression très faible ( $< 10^{-4}$ ). F. Feuille, T. Tige, RM. Racine moyenne, RFD. Racine fine différenciée, RFA. Racine fine apex, RXF. Racine extra-fine.

| N° | Nom de gène   | Organes    |             |             |              |             |             |  |
|----|---------------|------------|-------------|-------------|--------------|-------------|-------------|--|
|    |               | F          | T           | RM          | RFD          | RFA         | RXF         |  |
| 1  | SAMS          | 6,63E-03 a | 1,14E-02 a  | 2,92E-02 a  | 9,81E-03 a   | 2,93E-02 a  | 7,48E-02 a  |  |
| 2  | ACS1          | 3,98E-04 a | 1,97E-04 a  | 1,78E-04 a  | 5,66E-04 a   | 7,42E-04 a  | 4,01E-04 a  |  |
| 3  | ACSF3         | 2,28E-05 a | 1,92E-06 a  | 1,87E-06 a  | 1,69E-05 a   | 8,98E-05 a  | 4,67E-05 a  |  |
| 4  | ACSF10        | 4,88E-04 c | 2,19E-03 b  | 2,04E-03 b  | 4,40E-03 a   | 5,56E-03 a  | 1,47E-02 a  |  |
| 5  | ACO1          | 3,27E-03 a | 7,20E-03 a  | 1,37E-03 a  | 4,86E-03 a   | 1,83E-03 a  | 6,49E-03 a  |  |
| 6  | ACO2          | 3,39E-04 a | 7,81E-04 a  | 7,49E-04 a  | 9,65E-04 a   | 8,81E-04 a  | 3,27E-03 a  |  |
| 7  | ACO3          | 7,31E-02 a | 3,17E-03 b  | 1,07E-03 b  | 3,42E-03 b   | 2,90E-03 b  | 3,33E-02 b  |  |
| 8  | ETR1          | 7,66E-02 a | 6,07E-02 ab | 2,86E-02 ab | 1,79E-02 b   | 1,93E-02 b  | 5,81E-02 b  |  |
| 9  | ETR2          | 3,34E-06 a | 2,80E-05 a  | 6,16E-06 a  | 1,03E-05 a   | 4,27E-06 a  | 7,25E-06 a  |  |
| 10 | EIN3          | 1,88E-02 a | 9,49E-03 a  | 1,31E-02 a  | 8,93E-03 a   | 1,42E-02 a  | 6,28E-02 a  |  |
| 11 | EIN2          | 6,22E-02 a | 2,71E-02 ab | 1,40E-02 b  | 2,34E-02 ab  | 1,98E-02 ab | 6,60E-02 ab |  |
| 12 | MAPK          | 3,60E-03 a | 1,86E-03 a  | 1,81E-03 a  | 1,89E-03 a   | 1,43E-03 a  | 1,18E-02 a  |  |
| 13 | CIPK          | 4,14E-03 a | 9,59E-03 a  | 3,38E-02 a  | 5,11E-03 a   | 5,38E-03 a  | 1,68E-02 a  |  |
| 14 | ERF-Bark-IVb2 | 6,79E-03 a | 8,74E-03 a  | 3,54E-03 a  | 3,46E-03 a   | 1,98E-03 a  | 1,42E-02 a  |  |
| 15 | ERF-Root-1a   | 2,93E-03 a | 1,13E-03 a  | 5,08E-04 a  | 1,86E-03 a   | 2,14E-03 a  | 2,03E-02 a  |  |
| 16 | SAUR          | 2,05E-03 a | 3,43E-03 a  | 2,82E-03 a  | 1,77E-03 a   | 1,12E-03 a  | 4,23E-03 a  |  |
| 17 | COI1          | 3,23E-02 a | 2,46E-02 a  | 1,14E-02 a  | 1,86E-02 a   | 1,12E-02 a  | 4,41E-02 a  |  |
| 18 | WRKY          | 6,55E-04 a | 2,10E-04 a  | 3,64E-04 a  | 1,67E-04 a   | 1,86E-04 a  | 6,91E-04 a  |  |
| 19 | WRKY-col      | 1,07E-03 a | 2,02E-04 a  | 1,40E-04 a  | 5,85E-04 a   | 2,77E-04 a  | 1,06E-03 a  |  |
| 20 | MYB           | 2,77E-08 a | 7,67E-08 a  | 2,59E-08 a  | 0,00E+00 a   | 0,00E+00 a  | 0,00E+00 a  |  |
| 21 | SAP1          | 2,55E-01 a | 6,77E-02 b  | 3,79E-02 b  | 5,74E-02 b   | 2,99E-02 b  | 1,36E-01 b  |  |
| 22 | SAP2bis       | 1,68E-03 a | 1,19E-03 a  | 1,10E-03 a  | 1,83E-03 a   | 1,29E-03 a  | 4,35E-03 a  |  |
| 23 | SAP3bis       | 9,26E-02 a | 8,66E-02 a  | 4,99E-02 a  | 9,85E-02 a   | 4,89E-02 a  | 2,73E-01 a  |  |
| 24 | IAA/SHY       | 4,49E-02 b | 5,88E-01 a  | 4,28E-01 a  | 1,86E-01 a   | 2,11E-01 a  | 5,88E-01 a  |  |
| 25 | HB8           | 1,33E-01 a | 9,80E-02 a  | 2,67E-01 a  | 6,89E-02 a   | 9,58E-02 a  | 3,87E-01 a  |  |
| 26 | SLR2          | 6,69E-02 a | 4,62E-02 a  | 1,82E-02 a  | 7,42E-03 a   | 1,16E-01 a  | 6,06E-02 a  |  |
| 27 | TIR1          | 1,42E-01 a | 1,65E-02 b  | 2,10E-02 b  | 7,27E-03 b   | 1,82E-02 b  | 4,79E-02 b  |  |
| 28 | SHR           | 2,58E-02 a | 4,63E-03 a  | 5,27E-03 a  | 2,70E-02 a   | 6,51E-02 a  | 1,77E-01 a  |  |
| 29 | RGA           | 4,47E-02 a | 7,88E-03 a  | 1,34E-02 a  | 5,40E-03 a   | 1,76E-02 a  | 4,05E-02 a  |  |
| 30 | RAV1          | 7,06E-04 a | 1,56E-02 a  | 7,70E-03 a  | 2,00E-03 a   | 4,77E-02 a  | 1,88E-02 a  |  |
| 31 | CuZnSOD       | 4,71E-03 a | 9,29E-03 a  | 6,94E-04 b  | 7,77E-04 b   | 4,70E-04 b  | 7,21E-04 b  |  |
| 32 | MnSOD         | 3,75E-02 a | 2,76E-02 a  | 1,37E-02 a  | 3,55E-02 a   | 2,48E-02 a  | 6,07E-02 a  |  |
| 33 | CAT           | 5,12E-04 a | 5,82E-04 a  | 3,98E-04 a  | 4,27E-04 a   | 3,03E-04 a  | 8,56E-04 a  |  |
| 34 | APX1          | 9,22E-02 a | 3,90E-02 a  | 2,17E-02 a  | 3,58E-02 a   | 3,03E-02 a  | 5,98E-02 a  |  |
| 35 | APX2          | 1,42E-03 a | 7,58E-04 ab | 4,29E-04 bc | 2,89E-04 bcd | 2,05E-04 cd | 4,02E-04 d  |  |
| 36 | MDHAR         | 2,04E-02 a | 6,31E-03 a  | 3,17E-03 a  | 1,97E-02 a   | 1,19E-02 a  | 3,86E-02 a  |  |
| 37 | GCLcyto       | 1,43E-04 a | 5,39E-05 a  | 2,62E-05 a  | 7,93E-05 a   | 5,77E-05 a  | 1,50E-04 a  |  |
| 38 | GCLchloro     | 4,20E-03 a | 3,96E-03 a  | 2,56E-03 a  | 3,90E-03 a   | 3,49E-03 a  | 8,55E-03 a  |  |
| 39 | OASTL         | 3,41E-04 b | 3,50E-03 a  | 7,67E-04 ab | 1,20E-03 ab  | 9,77E-04 ab | 1,82E-03 ab |  |
| 40 | ACR           | 2,66E-04 a | 2,86E-04 a  | 1,57E-04 a  | 5,63E-05 b   | 5,98E-05 b  | 9,97E-05 b  |  |
| 41 | ACBP          | 1,07E-01 a | 8,45E-02 a  | 3,35E-02 a  | 7,38E-02 a   | 9,35E-03 a  | 4,08E-02 a  |  |
| 42 | CaM           | 2,86E-01 a | 1,18E-01 a  | 7,52E-02 a  | 1,62E-01 a   | 1,17E-01 a  | 6,09E-01 a  |  |
| 43 | CAS1          | 7,73E-03 a | 2,72E-03 a  | 1,27E-02 a  | 1,30E-02 a   | 1,21E-02 a  | 3,02E-02 a  |  |
| 44 | CAS2          | 9,29E+01 a | 1,01E+02 a  | 6,92E+01 a  | 1,69E+02 a   | 1,51E+02 a  | 4,21E+02 a  |  |
| 45 | CAS 3         | 8,20E-04 a | 7,26E-04 a  | 4,70E-04 a  | 7,58E-04 a   | 5,22E-04 a  | 6,09E-04 a  |  |
| 46 | GS            | 3,37E-01 a | 5,84E-02 ab | 2,63E-02 b  | 1,71E-01 a   | 1,38E-01 a  | 8,39E-01 a  |  |
| 47 | LTPP          | 2,31E+00 a | 8,94E-01 a  | 1,58E-02 b  | 3,79E-03 b   | 2,54E-03 b  | 4,53E-03 b  |  |
| 48 | UBI           | 2,60E-01 a | 1,81E-01 a  | 8,79E-02 a  | 1,86E-01 a   | 1,58E-01 a  | 5,09E-01 a  |  |

### 2.3 Comparaison des données morphologiques et physiologiques entre les plantes témoins et celles soumises au déficit hydrique

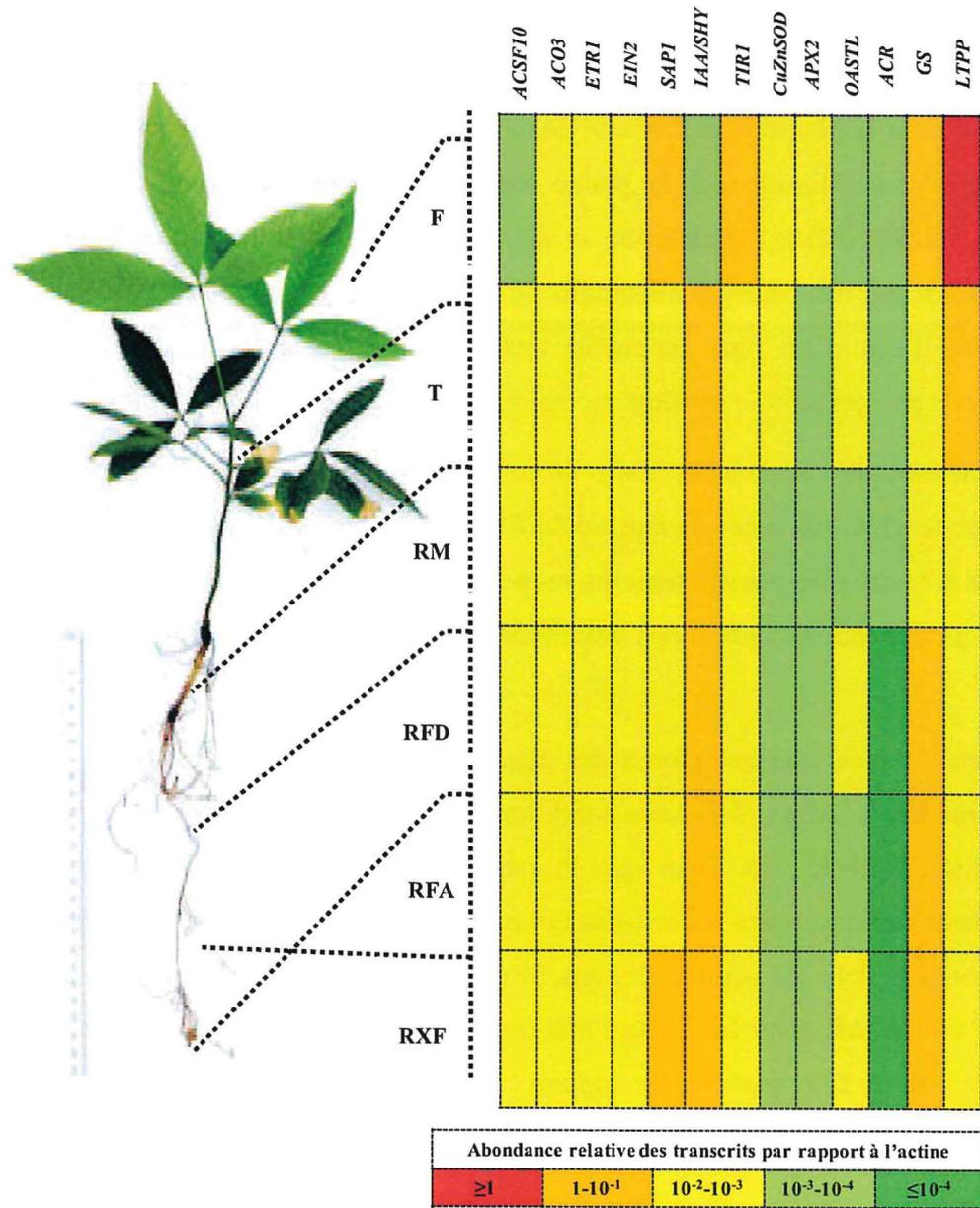
Dans cette expérience, nous avons comparé des plantes cultivées dans des conditions hydriques optimales et d'autres cultivées dans des conditions de déficit modéré. La fraction de l'eau disponible dans le sol est quantifiée par la *FTSW* (*Fraction of Transpirable Soil Water*) qui évolue entre 1 à 0. De manière pratique, c'est le rapport entre la quantité d'eau disponible dans le sol pour la plante à un moment donné (dite *ASW/ Available Soil Water*) et la quantité maximale d'eau utilisable par la plante lorsque le sol est réhydraté (dite *TTSW/ Total Transpirable Soil Water*) (Pellegrino *et al.*, 2005 ; Luquet *et al.*, 2008). Une *FTSW* de 1 représente un état des réserves maximum de l'eau du sol. Une *FTSW* de 0 représente un sol dans lequel l'eau n'est plus accessible aux racines des plantes. Ce déficit hydrique est appliqué aux plantes dont le système racinaire a colonisé l'ensemble du pot.

Les caractéristiques environnementales de culture sont contrôlées à la température de 27°C et l'humidité de 45%. Au cours de mesure de *FTSW*, une variation journalière (valeur de *FSTW* entre 0,98 à 1) chez les plantes témoins se met en place. Cela dépend du taux de transpiration par jour qui dépend des conditions environnementales (comm. personnelle Christine Sanier, 2010).

Les caractéristiques morphologiques des plantes (longueur des feuilles et des racines), et les poids de matière fraîche (*PMF*) sous condition de déficit hydrique n'est pas différent de celles de témoins (**Tableau 2a**). Bien que le rendement de l'extraction des ARN totaux soit sensiblement similaire entre les organes des plantes témoins et traitées, celui des racines fines et apex chutent. Pour les plantes témoins, le rendement est de  $139,27 \pm 130,64 \mu\text{g/gMF}$  et de  $55,48 \pm 27,68 \mu\text{g/gMF}$  pour les plantes traitées. Enfin, le rendement des racines extra-fines est très faible ( $6,82 \pm 2,50 \text{ g/gMF}$ ) par rapport aux autres organes chez les plantes témoins, et reste assez faible ( $13,98 \pm 3,85 \text{ g/gMF}$ ) chez les plantes traitées (**Tableau 2b**).

### 2.4 Comparaison des niveaux d'expression dans différents organes chez les plantes témoins

Dans le but de réaliser une cartographie spatiale des gènes marqueurs, le travail présenté ici porte sur l'analyse de l'expression basale de 48 gènes dans des plantes cultivées dans des conditions hydriques normales (*FTSW* = 1). L'analyse des résultats révèle que 13 gènes sont différentiellement exprimés de manière significative dans les feuilles, les tiges et les différents types de racines (**Tableau 3**).



**Figure 6.** Description des gènes exprimés différemment au niveau basal dans différents organes chez les somaplants âgés de 7 mois. (F) feuille, (T) tige, RM. Racine moyenne, RFD. Racine fine différenciée, RFA. Racine extra-fine, RXF. Racine fine apex. Les niveaux d'expression sont révélés par la dégradation des couleurs.

Parmi les gènes impliqués dans la biosynthèse de l'éthylène, deux gènes montrent aussi une réponse opposée au niveau des organes. D'une part, les transcrits *ACSF10* s'accumulent moins au niveau foliaire, et plus fortement dans les racines fines différenciées et apex, et les racines extra-fines. D'autre part, l'abondance relative des transcrits *ACO3* se distingue significativement chez les feuilles par rapport aux autres organes.

Parmi les gènes impliqués dans les voies de signalisation, les gènes sont plus faiblement exprimés au niveau racinaire par rapport au niveau aérien. L'abondance relative des transcrits *EIN2* est plus faible dans les racines moyennes. Par contre, l'accumulation des transcrits du gène *ETR1* est moins forte dans les racines fines différenciées et apex et les racines extra-fines par rapport aux autres organes. L'abondance relative des transcrits du gène *SAP1* relié à la défense est plus forte dans les feuilles.

Parmi les gènes impliqués dans le développement racinaire, deux gènes sont différemment régulés dans les organes étudiés. L'abondance relative des transcrits du gène *IAA/SHY* est plus faible au niveau foliaire que dans les autres organes. Par contre, le gène *TIR1* a un niveau d'expression plus élevé chez les feuilles.

Parmi les gènes impliqués dans les systèmes de détoxification d'EAO, certains gènes démontrent encore des expressions différentielles. Premièrement, le gène *CuZnSOD* s'exprime plus faiblement au niveau racinaire par rapport au niveau aérien des plantes. Deuxièmement, l'accumulation des transcrits du gène *APX2* est faible dans les tiges et les différents types de racines. Troisièmement, le gène *OASTL* s'exprime plus fortement dans les feuilles que dans les autres organes.

Parmi les gènes impliqués dans le métabolisme, trois montrent une régulation spatiale différentielle. L'accumulation des transcrits des gènes *ACR* est moins forte dans les racines fines différenciées et apex, et les racines extra-fines, par rapport aux autres organes. Le gène *GS* s'exprime plus faiblement dans les racines moyennes, alors que l'expression du gène *LTPP* est plutôt faible dans l'ensemble des racines. Ce dernier est fortement exprimé au niveau foliaire.

Enfin, dans un point de vue global, les deux gènes impliqués dans les systèmes de détoxification des EAO (*CuZnSOD* et *APX2*) et le gène de métabolisme *ACR* sont plus faiblement exprimés au niveau racinaire par rapport aux autres gènes. Le gène *LTPP* est le plus fortement exprimé au niveau foliaire (**Figure 6**).

**Tableau 4.** Comparaison des niveaux d'expression dans de différents organes chez les somaplants âgés de 7 mois sous stress hydrique (FTSW=0,4). Les lettres démontrent les significativités : a (plus forte), b (moyenne), c (faible), d (très faible), e (vraiment faible). La boîte en rouge signifie une forte expression ( $\geq 1$ ), en orange signifie une expression assez forte ( $10^{-1} \leq x < 1$ ), en jaune signifie une expression modeste ( $10^{-3} \leq x < 10^{-1}$ ), en vert signifie une expression faible ( $10^{-4} \leq x < 10^{-3}$ ), en vert foncé signifie une expression très faible ( $< 10^{-4}$ ). F. Feuille, T. Tige, RM. Racine moyenne, RFD. Racine fine différenciée, RFA. Racine fine apex, RXF. Racine extra-fine.

| N° | Nom de gène   | Organes     |              |             |             |             |             |
|----|---------------|-------------|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
|    |               | F           | T            | RM          | RFD         | RFA         | RXF         |
| 1  | SAMS          | 7,67E-03 a  | 2,59E-02 a   | 2,97E-02 a  | 7,43E-03 a  | 1,41E-02 a  | 6,98E-03 a  |
| 2  | ACS1          | 8,56E-04 a  | 4,43E-05 b   | 1,28E-04 b  | 7,73E-04 a  | 9,59E-04 a  | 1,51E-03 a  |
| 3  | ACSF3         | 5,44E-05 a  | 1,73E-05 a   | 5,28E-07 a  | 3,50E-05 a  | 1,59E-06 a  | 1,48E-05 a  |
| 4  | ACSF10        | 3,83E-04 b  | 1,36E-03 ab  | 1,60E-03 ab | 2,64E-03 ab | 8,06E-03 a  | 6,89E-03 a  |
| 5  | ACO1          | 1,83E-03 a  | 1,27E-03 a   | 1,39E-03 a  | 3,23E-03 a  | 3,16E-03 a  | 2,28E-03 a  |
| 6  | ACO2          | 7,03E-04 a  | 1,51E-03 a   | 1,07E-03 a  | 8,08E-04 a  | 4,76E-04 a  | 4,09E-04 a  |
| 7  | ACO3          | 6,69E-02 a  | 3,71E-03 b   | 4,17E-04 b  | 1,75E-03 b  | 7,76E-04 b  | 3,29E-03 b  |
| 8  | ETR1          | 1,78E-01 a  | 7,89E-02 a   | 2,40E-02 b  | 1,29E-02 b  | 1,90E-02 b  | 2,00E-02 b  |
| 9  | ETR2          | 6,56E-06 a  | 3,67E-05 a   | 8,37E-06 a  | 1,11E-05 a  | 2,01E-05 a  | 1,30E-05 a  |
| 10 | EIN3          | 3,78E-02 a  | 1,66E-02 a   | 1,16E-02 a  | 1,07E-02 a  | 1,41E-02 a  | 1,29E-02 a  |
| 11 | EIN2          | 1,27E-01 a  | 2,17E-02 bc  | 1,40E-02 c  | 1,30E-02 c  | 1,87E-02 bc | 3,25E-02 b  |
| 12 | MAPK          | 7,87E-03 a  | 3,20E-03 a   | 1,98E-03 a  | 1,98E-03 a  | 2,00E-03 a  | 3,15E-03 a  |
| 13 | CIPK          | 4,97E-03 ab | 3,23E-02 a   | 6,19E-02 a  | 1,10E-03 b  | 5,68E-03 ab | 9,62E-04 b  |
| 14 | ERF-Bark-IVb2 | 1,29E-02 a  | 1,07E-02 a   | 6,53E-03 a  | 2,07E-03 a  | 6,11E-03 a  | 4,76E-03 a  |
| 15 | ERF-Root-1a   | 2,31E-03 a  | 9,21E-04 a   | 5,77E-04 a  | 8,58E-04 a  | 1,18E-03 a  | 3,03E-03 a  |
| 16 | SAUR          | 2,93E-03 a  | 2,67E-03 a   | 2,52E-03 a  | 1,53E-03 a  | 9,46E-04 a  | 1,41E-03 a  |
| 17 | COI1          | 6,17E-02 a  | 5,86E-02 a   | 2,36E-02 a  | 1,15E-02 a  | 1,69E-02 a  | 1,90E-02 a  |
| 18 | WRKY          | 2,08E-04 a  | 3,65E-04 a   | 3,70E-04 a  | 1,84E-05 a  | 1,93E-04 a  | 3,50E-05 a  |
| 19 | WRKY-col      | 1,10E-03 a  | 1,29E-04 d   | 3,90E-05 e  | 3,68E-04 bc | 2,43E-04 c  | 6,66E-04 ab |
| 20 | MYB           | 8,53E-08 a  | 8,42E-08 ab  | 2,04E-08 b  | 4,72E-08 ab | 0,00E+00 ab | 1,09E-07 a  |
| 21 | SAP1          | 2,45E-01 a  | 6,36E-02 b   | 3,68E-02 c  | 2,99E-02 c  | 2,40E-02 c  | 3,58E-02 c  |
| 22 | SAP2bis       | 2,96E-03 a  | 1,65E-03 a   | 1,15E-03 a  | 1,02E-03 a  | 1,07E-03 a  | 1,61E-03 a  |
| 23 | SAP3bis       | 8,69E-02 a  | 5,13E-02 ab  | 3,39E-02 b  | 5,48E-02 ab | 2,94E-02 b  | 8,20E-02 a  |
| 24 | IAA/SHY       | 3,20E-02 b  | 2,78E-01 a   | 2,67E-01 a  | 2,26E-01 a  | 2,08E-01 a  | 1,82E-01 a  |
| 25 | HB8           | 1,57E-01 a  | 1,95E-01 a   | 2,85E-01 a  | 4,46E-02 a  | 8,59E-02 a  | 4,28E-02 a  |
| 26 | SLR2          | 6,41E-02 a  | 1,96E-02 a   | 1,37E-02 a  | 9,13E-03 a  | 1,21E-01 a  | 1,22E-02 a  |
| 27 | TIR1          | 1,21E-01 a  | 2,29E-02 b   | 1,67E-02 bc | 5,23E-03 c  | 1,05E-02 bc | 6,60E-03 bc |
| 28 | SHR           | 1,06E-02 a  | 5,63E-03 a   | 1,46E-02 a  | 1,60E-02 a  | 3,93E-02 a  | 2,50E-02 a  |
| 29 | RGA           | 4,00E-03 a  | 1,74E-02 a   | 1,94E-02 a  | 3,60E-04 a  | 3,54E-03 a  | 5,42E-04 a  |
| 30 | RAV1          | 1,23E-03 b  | 3,90E-02 a   | 1,82E-02 ab | 1,12E-03 b  | 1,01E-02 ab | 7,49E-04 b  |
| 31 | CuZnSOD       | 1,05E-02 a  | 1,20E-02 a   | 6,62E-04 b  | 5,37E-04 b  | 4,85E-04 b  | 3,75E-04 b  |
| 32 | MnSOD         | 4,21E-02 a  | 2,65E-02 a   | 1,02E-02 a  | 3,32E-02 a  | 3,12E-02 a  | 4,51E-02 a  |
| 33 | CAT           | 6,63E-04 a  | 6,41E-04 a   | 2,11E-04 a  | 4,59E-04 a  | 2,87E-04 a  | 8,78E-04 a  |
| 34 | APX1          | 9,28E-02 a  | 5,39E-02 ab  | 1,44E-02 b  | 3,35E-02 ab | 4,84E-02 ab | 4,93E-02 ab |
| 35 | APX2          | 1,18E-03 a  | 5,70E-04 b   | 4,20E-04 b  | 4,07E-04 b  | 3,18E-04 b  | 5,29E-04 b  |
| 36 | MDHAR         | 1,81E-02 a  | 7,87E-03 abc | 3,34E-03 c  | 5,38E-03 bc | 6,36E-03 bc | 1,53E-02 ab |
| 37 | GCLcyto       | 9,80E-05 a  | 4,19E-05 a   | 2,44E-05 a  | 8,41E-05 a  | 6,65E-05 a  | 9,93E-05 a  |
| 38 | GCLchloro     | 6,28E-03 a  | 3,37E-03 a   | 2,46E-03 a  | 3,88E-03 a  | 3,86E-03 a  | 4,89E-03 a  |
| 39 | OASTL         | 7,93E-04 ab | 2,15E-03 a   | 3,89E-04 b  | 4,84E-04 b  | 7,53E-04 ab | 8,75E-04 ab |
| 40 | ACR           | 4,24E-04 a  | 1,81E-04 ab  | 1,13E-04 bc | 5,77E-05 bc | 4,10E-05 c  | 5,71E-05 bc |
| 41 | ACBP          | 1,91E-01 a  | 6,75E-02 a   | 3,27E-02 a  | 5,92E-02 a  | 2,25E-02 a  | 8,37E-02 a  |
| 42 | CaM           | 8,41E-02 a  | 5,11E-02 a   | 4,96E-02 a  | 6,49E-02 a  | 6,23E-02 a  | 1,24E-01 a  |
| 43 | CAS1          | 2,29E-03 a  | 5,09E-03 a   | 1,19E-02 a  | 5,85E-03 a  | 9,64E-03 a  | 6,40E-03 a  |
| 44 | CAS2          | 4,04E+01 a  | 2,27E+01 a   | 2,35E+01 a  | 5,14E+01 a  | 7,00E+01 a  | 1,14E+02 a  |
| 45 | CAS 3         | 1,03E-03 a  | 3,12E-04 ab  | 1,65E-04 b  | 7,12E-04 a  | 4,97E-04 ab | 1,08E-03 a  |
| 46 | GS            | 1,19E-01 a  | 1,71E-02 ab  | 6,90E-03 b  | 3,42E-02 ab | 2,45E-02 ab | 1,30E-01 a  |
| 47 | LTPP          | 2,86E+00 a  | 1,16E+00 a   | 3,55E-02 b  | 7,48E-03 c  | 5,77E-03 c  | 6,38E-03 c  |
| 48 | UBI           | 9,68E-01 a  | 1,99E-01 a   | 1,04E-01 a  | 1,88E-01 a  | 1,26E-01 a  | 3,95E-01 a  |

## 2.5 Comparaison des niveaux d'expression dans de différents organes chez les plantes placées en condition de déficit hydrique

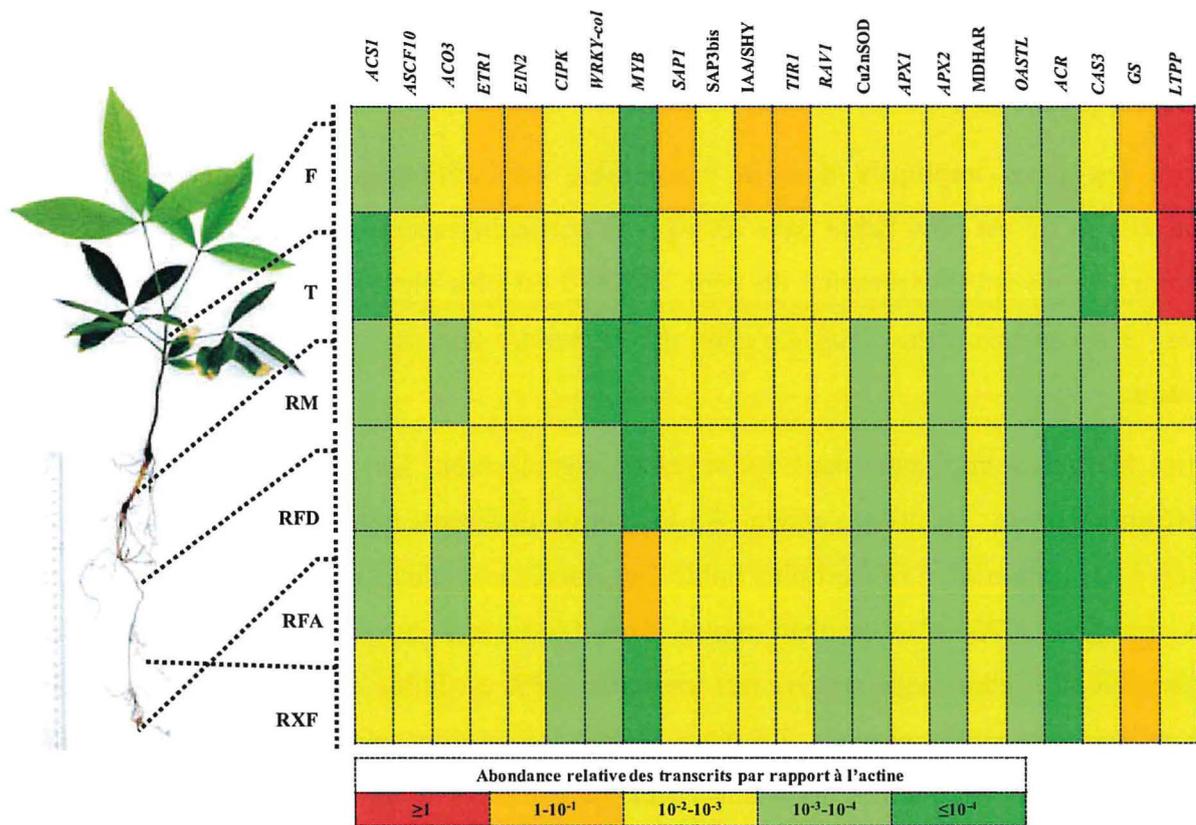
Cette partie est dédiée à la recherche d'une expression différentielle significative de 48 gènes en réponse à un déficit hydrique modéré ( $FTSW=0,4$ ). L'ensemble des résultats révèle 22 gènes différentiellement exprimés dans les feuilles, les tiges, et les différents types des racines (**Tableau 4**), soit 9 gènes de plus par rapport à des plantes cultivées dans des conditions normales ( $FTSW=1$ ).

Parmi les gènes impliqués dans la biosynthèse de l'éthylène, l'abondance relative des transcrits *ACS1* est plus faible dans les tiges et particulièrement dans les racines moyennes. Pourtant, le niveau d'expression du gène *ACSF10* est plus élevé dans les apex des racines fines, et les racines extra-fines. Le gène *ACO3* montre une expression plus forte au niveau foliaire.

Parmi les gènes impliqués dans les voies de signalisation, les gènes régulés s'expriment préférentiellement au niveau aérien. Au niveau de différents types de racines, l'abondance relative des transcrits *ETR1* est plus faible dans toutes les racines que dans la partie aérienne. Les transcrits *EIN2* s'accumulent moins dans les racines moyennes et les racines fines différenciées. L'abondance relative des transcrits *CIPK* est faible dans les racines extra-fines par rapport aux autres organes. Le gène *WRKY-col* est sous-exprimé au niveau racinaire, notamment dans les racines moyennes. Les gènes *SAP1* et *SAP3bis* reliés à la défense montrent aussi une réponse plus forte au niveau foliaire. Le gène *MYB* se différencie par une expression quasi-nulle dans tous les tissus.

Parmi les gènes impliqués dans le développement racinaire, trois gènes répondent significativement à un déficit hydrique modéré au niveau des organes. L'abondance relative des transcrits *IAA/SHY* est plus faible au niveau foliaire que dans les autres organes. A l'inverse, les transcrits *TIR1* s'accumulent plus dans les feuilles que dans les racines. Pour le gène *RAVI*, une baisse de l'abondance relative des transcrits est perceptible dans les racines et surtout dans les racines extra-fines.

Parmi les gènes impliqués dans les systèmes de détoxification d'EAO, 5 gènes (*CuZnSOD*, *APX1*, *APX2*, *MDHAR*, et *OASTL*) sont différentiellement exprimés dans les différents organes en réponse à un déficit hydrique. Globalement, ils s'expriment plutôt plus fortement dans la partie aérienne des plantes. Seuls les gènes *CuZnSOD* et *APX2* montrent une forte sous-expression au niveau racinaire.



**Figure 7.** Description des gènes exprimés différemment sous déficit hydrique dans différents organes chez les somaplants âgés de 7 mois. F. Feuille, T. Tige, RM. Racine moyenne, RFD. Racine fine différenciée, RFA. Racine fine apex, RXF. Racine extra-fine. Les niveaux d'expression sont révélés par la dégradation des couleurs.

Parmi les gènes impliqués dans le métabolisme, le gène *ACR* montre un faible niveau d'expression dans l'ensemble des organes et de manière exacerbée dans les racines. Le gène codant la bêta-cyanoalanine synthase *CAS3* pour la détoxification du cyanure s'exprime plus faiblement dans les racines moyennes par rapport aux autres organes. Le gène *GS* est plus fortement régulé dans les feuilles et les racines extra-fines. Enfin, le gène *LTPP* est plus fortement exprimé au niveau des feuilles et des racines extra-fines que dans les autres organes (**Tableau 4**).

Enfin, dans un point de vue global, les gènes impliqués dans la biosynthèse de l'éthylène (*ACO3*) et ceux impliqués dans la perception et la signalisation de l'éthylène (*ETR1*, *EIN2*) ont une expression modulée par le déficit hydrique. L'expression opposée de deux gènes *MYB* et *LTPP* est très marquée. Le gène *ACR* montre une forte sous-régulation dans tous les organes (**Figure 7**).

#### 2.6 Effet d'un déficit hydrique sur l'expression génique des gènes cibles dans les différents organes

Afin de pouvoir révéler l'effet d'un déficit hydrique modéré sur l'expression des gènes cibles dans les différents organes, le rapport entre l'abondance relative des transcrits des plantes traitées et témoins a été réalisé. L'analyse statistique a visé à calculer les valeurs de *p* par le test de Fischer pour chaque comparaison traité/témoin au sein d'un même organe afin de déterminer si cette variation est significative (**Tableau 5**). A partir de 48 gènes étudiés, 10 gènes se révèlent être significativement régulés dans certains organes.

Parmi les gènes impliqués dans la biosynthèse de l'éthylène, seul le gène *ACSI* répond au déficit hydrique. L'expression de ce gène est fortement stimulée par le déficit hydrique dans les racines fines différenciées, alors qu'une répression de l'expression génique est visible au niveau des tiges (**Tableau 5a**).

Parmi les gènes impliqués dans les voies de signalisation, 3 gènes s'expriment différemment dans les organes étudiés. L'expression du gène *ETR2* montre une légère surexpression dans les racines extra-fines, tandis que les gènes *EIN2* et *SAP3bis* sont fortement réprimés dans les racines fines différenciées.

Parmi les gènes impliqués dans le développement racinaire, il n'y a pas de régulation génique significative au niveau des racines en réponse au déficit hydrique.

**Tableau 5a.** Rapport entre l'expression génique des somaplants âgés de 7 mois sous déficit hydrique ( $FTSW=0,4$ ) et leur témoin. La boîte en rouge signifie une surexpression, en vert signifie une sous-expression, et en orange signifie des valeurs marquantes non-significatives.

| N° | Nom de gène   | Organes |      |      |      |      |      |
|----|---------------|---------|------|------|------|------|------|
|    |               | F       | T    | RM   | RFD  | RFA  | RXF  |
| 1  | SAMS          | 1,16    | 2,27 | 1,01 | 0,76 | 0,48 | 0,09 |
|    | p-value       | 0,94    | 0,21 | 0,98 | 0,85 | 0,68 | 0,56 |
| 2  | ACS1          | 2,15    | 0,22 | 0,72 | 1,37 | 1,29 | 3,76 |
|    | p-value       | 0,28    | 0,00 | 0,50 | 0,37 | 0,68 | 0,02 |
| 3  | ACSF3         | 2,39    | 9,04 | 0,28 | 2,07 | 0,02 | 0,32 |
|    | p-value       | 0,82    | 0,42 | 0,21 | 0,69 | 0,13 | 0,79 |
| 4  | ACSF10        | 0,78    | 0,62 | 0,79 | 0,60 | 1,45 | 0,47 |
|    | p-value       | 0,37    | 0,35 | 0,48 | 0,05 | 0,81 | 0,16 |
| 5  | ACO1          | 0,56    | 0,18 | 1,02 | 0,67 | 1,73 | 0,35 |
|    | p-value       | 0,96    | 0,06 | 0,66 | 0,32 | 0,30 | 0,97 |
| 6  | ACO2          | 2,07    | 1,94 | 1,43 | 0,84 | 0,54 | 0,12 |
|    | p-value       | 0,11    | 0,62 | 0,94 | 0,53 | 0,17 | 0,11 |
| 7  | ACO3          | 0,92    | 1,17 | 0,39 | 0,51 | 0,27 | 0,10 |
|    | p-value       | 0,78    | 0,65 | 0,14 | 0,26 | 0,12 | 0,42 |
| 8  | ETR1          | 2,32    | 1,30 | 0,84 | 0,72 | 0,98 | 0,34 |
|    | p-value       | 0,07    | 0,43 | 0,63 | 0,58 | 0,89 | 0,90 |
| 9  | ETR2          | 1,96    | 1,31 | 1,36 | 1,08 | 4,72 | 1,80 |
|    | p-value       | 0,30    | 0,55 | 0,74 | 0,77 | 0,17 | 0,03 |
| 10 | EIN3          | 2,01    | 1,75 | 0,88 | 1,20 | 1,00 | 0,21 |
|    | p-value       | 0,31    | 0,13 | 0,90 | 0,70 | 0,89 | 0,33 |
| 11 | EIN2          | 2,04    | 0,80 | 1,00 | 0,56 | 0,95 | 0,49 |
|    | p-value       | 0,20    | 0,38 | 0,92 | 0,01 | 0,99 | 0,35 |
| 12 | MAPK          | 2,19    | 1,72 | 1,09 | 1,05 | 1,40 | 0,27 |
|    | p-value       | 0,43    | 0,21 | 0,84 | 0,68 | 0,49 | 0,90 |
| 13 | CIPK          | 1,20    | 3,37 | 1,83 | 0,22 | 1,06 | 0,06 |
|    | p-value       | 0,55    | 0,18 | 0,60 | 0,82 | 0,84 | 0,67 |
| 14 | ERF-Bark-IVb2 | 1,90    | 1,23 | 1,85 | 0,60 | 3,08 | 0,34 |
|    | p-value       | 0,30    | 0,33 | 0,35 | 0,85 | 0,72 | 0,66 |
| 15 | ERF-Root-Ia   | 0,79    | 0,82 | 1,14 | 0,46 | 0,55 | 0,15 |
|    | p-value       | 0,49    | 0,59 | 0,69 | 0,59 | 0,24 | 0,36 |
| 16 | SAUR          | 1,43    | 0,78 | 0,89 | 0,87 | 0,84 | 0,33 |
|    | p-value       | 0,53    | 0,99 | 0,73 | 0,91 | 0,69 | 0,96 |
| 17 | COI1          | 1,91    | 2,38 | 2,07 | 0,62 | 1,50 | 0,43 |
|    | p-value       | 0,17    | 0,45 | 0,34 | 0,40 | 0,54 | 0,51 |
| 18 | WRKY          | 0,32    | 1,74 | 1,01 | 0,11 | 1,04 | 0,05 |
|    | p-value       | 0,47    | 0,22 | 0,82 | 0,65 | 0,51 | 0,32 |
| 19 | WRKY-col      | 1,03    | 0,64 | 0,28 | 0,63 | 0,88 | 0,63 |
|    | p-value       | 0,87    | 0,24 | 0,12 | 0,68 | 0,76 | 0,19 |
| 20 | MYB           | 3,08    | 1,10 | 0,79 | nc   | nc   | nc   |
|    | p-value       | 0,23    | 0,77 | 0,46 | 1,00 | nc   | nc   |
| 21 | SAP1          | 0,96    | 0,94 | 0,97 | 0,52 | 0,80 | 0,26 |
|    | p-value       | 0,92    | 0,79 | 0,74 | 0,22 | 0,90 | 0,20 |
| 22 | SAP2bis       | 1,76    | 1,38 | 1,04 | 0,56 | 0,83 | 0,37 |
|    | p-value       | 0,24    | 0,36 | 0,96 | 0,17 | 0,81 | 0,70 |
| 23 | SAP3bis       | 0,94    | 0,59 | 0,68 | 0,56 | 0,60 | 0,30 |
|    | p-value       | 0,76    | 0,88 | 0,35 | 0,05 | 0,73 | 0,91 |
| 24 | IAA/SHY       | 0,71    | 0,47 | 0,63 | 1,22 | 0,99 | 0,31 |
|    | p-value       | 0,64    | 0,26 | 0,15 | 0,50 | 0,94 | 0,75 |

Parmi les gènes impliqués dans les systèmes de détoxification d'EAO, 2 gènes se comportent différemment dans les organes en réponse au stress. L'expression du gène *APX2* est stimulée légèrement dans les racines extra-fines. L'expression du gène *OASTL* est fortement stimulée dans les feuilles (**Tableau 5b**).

Parmi les gènes des métabolismes, 4 gènes répondent de manière significative au déficit hydrique dans les organes étudiés. Globalement, la localisation des réponses se voient dans les racines, sauf pour le gène *CaM*. Le gène *ACBP* montre respectivement une forte stimulation dans les racines extra-fines. L'expression du gène *CAS2* est réprimée dans les racines moyennes. Il faut noter que les expressions des gènes *CAS2*, et *GS* sont fortement réprimées dans les racines fines différenciées. Seul le gène *GS* répond au déficit hydrique par une forte répression génique dans les apex des racines fines.

Tous les gènes qui sont régulés significativement en réponse à un déficit hydrique le sont dans les racines extra-fines et présentent une surexpression quel que soit forte ou légère. (**Figure 8**).

### 3 Discussion

#### 3.1 Régulation différentielle forte de l'abondance relative des transcrits au niveau spatial

L'étude de l'expression de 48 gènes impliqués dans différentes fonctions physiologiques permet de mettre en évidence une régulation spatiale différentielle chez *Hevea brasiliensis*. La régulation spatiale de ces gènes est exacerbée par le déficit hydrique modéré : 13 gènes chez les plantes témoins contre 22 chez les plantes traitées (**Figure 6 et 7**). Ce résultat indique que certains gènes sont spécifiques et ont un niveau d'expression qui varie en fonction de l'organe étudié.

Certains gènes de la voie de biosynthèse et de signalisation de l'éthylène (*ACSI*, *ACSF10*, *ACO3*, *ETRI*) montrent une régulation spatiale. Nous observons une augmentation de l'abondance de transcrits de l'*ACSF10* et une réduction pour *ACO3* et *ETRI* au niveau des racines pour les plantes témoins et traitées. Cette antagonisme au niveau de la biosynthèse de l'ET est peut-être liée au fait que d'autres membres des familles multigéniques *ACS* et *ACO* existent dans les racines car ces gènes ont été isolés à partir d'ARN d'écorce (*Kuswanhadi et al.*, In press). En effet, l'éthylène est impliqué dans plusieurs processus développementaux et bien connus pour sa régulation spatiale (Barry *et al.*, 1996 ; Tang et Woodson, 1996 ; Petruzzelli *et al.*, 2000 ; Gallie et Young, 2004 ; Frankowski *et al.*, 2007).

**Tableau 5b.** Rapport entre l'expression génique des somaplants âgés de 7 mois sous déficit hydrique ( $F_{TSW}=0,4$ ) et leur témoin. La boîte en rouge signifie une surexpression, en vert signifie une sous-expression, et en orange signifie des valeurs marquantes non-significatives (continue).

| N° | Nom de gène | Organes |      |      |      |      |      |
|----|-------------|---------|------|------|------|------|------|
|    |             | F       | T    | RM   | RFD  | RFA  | RXF  |
| 25 | HB8         | 1,19    | 1,99 | 1,07 | 0,65 | 0,90 | 0,11 |
|    | p-value     | 0,83    | 0,08 | 1,00 | 0,60 | 0,67 | 0,43 |
| 26 | SLR2        | 0,96    | 0,43 | 0,75 | 1,23 | 1,04 | 0,20 |
|    | p-value     | 0,89    | 0,57 | 0,61 | 0,76 | 0,99 | 0,93 |
| 27 | TIR1        | 0,85    | 1,39 | 0,80 | 0,72 | 0,58 | 0,14 |
|    | p-value     | 0,57    | 0,37 | 0,68 | 0,62 | 0,24 | 0,19 |
| 28 | SHR         | 0,41    | 1,22 | 2,76 | 0,59 | 0,60 | 0,14 |
|    | p-value     | 0,39    | 0,49 | 0,11 | 0,54 | 0,49 | 0,28 |
| 29 | RGA         | 0,09    | 2,20 | 1,45 | 0,07 | 0,20 | 0,01 |
|    | p-value     | 0,84    | 0,23 | 0,83 | 0,40 | 0,49 | 0,35 |
| 30 | RAV1        | 1,74    | 2,51 | 2,36 | 0,56 | 0,21 | 0,04 |
|    | p-value     | 0,49    | 0,17 | 0,78 | 0,90 | 0,80 | 0,30 |
| 31 | CuZnSOD     | 2,23    | 1,29 | 0,95 | 0,69 | 1,03 | 0,52 |
|    | p-value     | 0,35    | 0,42 | 0,87 | 0,75 | 0,43 | 0,47 |
| 32 | MnSOD       | 1,12    | 0,96 | 0,75 | 0,93 | 1,26 | 0,74 |
|    | p-value     | 0,56    | 0,80 | 0,47 | 0,92 | 0,96 | 0,19 |
| 33 | CAT         | 1,30    | 1,10 | 0,53 | 1,08 | 0,95 | 1,03 |
|    | p-value     | 0,62    | 0,97 | 0,12 | 0,83 | 0,84 | 0,07 |
| 34 | APX1        | 1,01    | 1,38 | 0,66 | 0,94 | 1,60 | 0,82 |
|    | p-value     | 0,81    | 0,78 | 0,28 | 0,79 | 0,65 | 0,07 |
| 35 | APX2        | 0,83    | 0,75 | 0,98 | 1,41 | 1,55 | 1,32 |
|    | p-value     | 0,59    | 0,74 | 0,90 | 0,37 | 0,28 | 0,02 |
| 36 | MDHAR       | 0,89    | 1,25 | 1,05 | 0,27 | 0,53 | 0,40 |
|    | p-value     | 0,64    | 0,44 | 0,81 | 0,14 | 0,62 | 0,82 |
| 37 | GCLcyto     | 0,69    | 0,78 | 0,93 | 1,06 | 1,15 | 0,66 |
|    | p-value     | 0,51    | 0,42 | 0,87 | 0,80 | 0,95 | 0,31 |
| 38 | GCLchloro   | 1,49    | 0,85 | 0,96 | 0,99 | 1,11 | 0,57 |
|    | p-value     | 0,27    | 0,52 | 0,90 | 1,00 | 0,95 | 0,26 |
| 39 | OASTL       | 2,32    | 0,61 | 0,51 | 0,40 | 0,77 | 0,48 |
|    | p-value     | 0,01    | 0,57 | 0,07 | 0,16 | 0,91 | 0,38 |
| 40 | ACR         | 1,59    | 0,63 | 0,72 | 1,03 | 0,69 | 0,57 |
|    | p-value     | 0,12    | 0,20 | 0,23 | 0,80 | 0,41 | 0,25 |
| 41 | ACBP        | 1,78    | 0,80 | 0,97 | 0,80 | 2,41 | 2,05 |
|    | p-value     | 0,62    | 0,93 | 0,93 | 0,80 | 0,23 | 0,01 |
| 42 | CaM         | 0,29    | 0,43 | 0,66 | 0,40 | 0,53 | 0,20 |
|    | p-value     | 0,03    | 0,08 | 0,43 | 0,08 | 0,12 | 0,44 |
| 43 | CAS1        | 0,30    | 1,87 | 0,94 | 0,45 | 0,80 | 0,21 |
|    | p-value     | 0,13    | 0,24 | 0,88 | 0,41 | 0,48 | 0,92 |
| 44 | CAS2        | 0,43    | 0,22 | 0,34 | 0,30 | 0,46 | 0,27 |
|    | p-value     | 0,06    | 0,17 | 0,05 | 0,02 | 0,30 | 0,83 |
| 45 | CAS3        | 1,25    | 0,43 | 0,35 | 0,94 | 0,95 | 1,77 |
|    | p-value     | 0,64    | 0,05 | 0,15 | 0,78 | 0,70 | 0,05 |
| 46 | GS          | 0,35    | 0,29 | 0,26 | 0,20 | 0,18 | 0,15 |
|    | p-value     | 0,42    | 0,06 | 0,13 | 0,01 | 0,03 | 0,17 |
| 47 | LTPP        | 1,24    | 1,30 | 2,25 | 1,98 | 2,27 | 1,41 |
|    | p-value     | 0,49    | 0,24 | 0,25 | 0,19 | 0,45 | 0,30 |
| 48 | UBI         | 3,72    | 1,10 | 1,19 | 1,01 | 0,80 | 0,78 |
|    | p-value     | 0,16    | 0,62 | 0,53 | 0,94 | 0,52 | 0,27 |

Les gènes impliqués dans le développement racinaire (*IAA/SHY*, *HB8*, *SLR*, *TIR1*, *SHR*, *RGA*, *RAVI*) que nous avons étudié ne montre pas une régulation spécifique, mais sont constitutivement exprimés dans tous les tissus (**Tableau 3**). Chez *Arabidopsis*, certains gènes du développement racinaire sont induits en cas de déficit hydrique, tels que le *SHR*, *ANR*, etc. (Montiel *et al.*, 2004 ; Dinnyen *et al.*, 2008). Par contre, dans nos conditions expérimentales, nous n'observons pas d'effet du déficit hydrique sur les gènes étudiés.

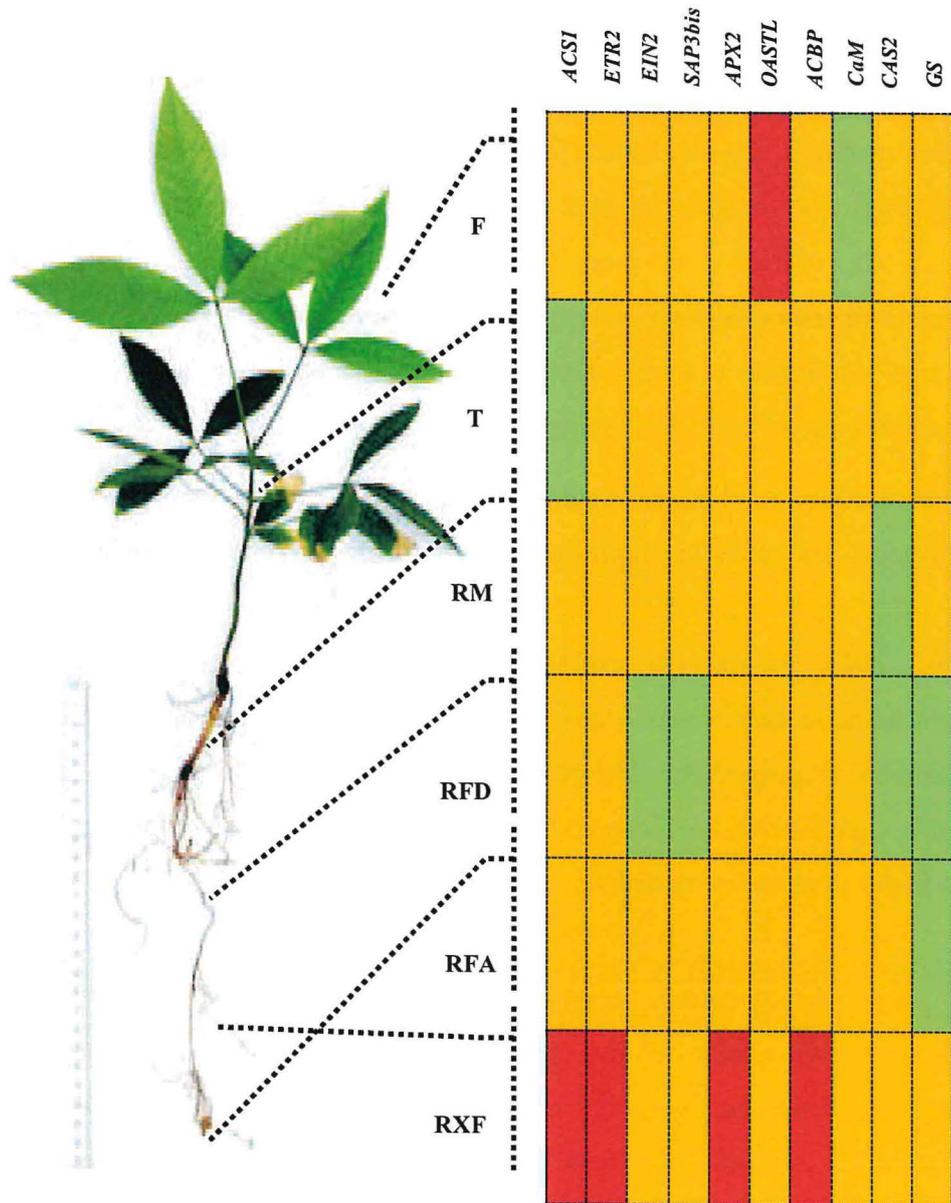
Au niveau des systèmes antioxydants, l'accumulation des transcrits est plus forte dans les feuilles et les tiges que dans les racines de manière générale pour les plantes non traitées (*CuZnSOD*, *APX2*, *OASTL*), et pour les plantes traitées d'autres gènes apparaissent significativement régulés (*MnSOD*, *APX1*). Enfin, les transcrits du gène *LTPP* sont fortement représentés dans les feuilles et la tige comparativement aux racines, ce qui a été décrit chez d'autres espèces tel que le maïs (Sossountzov *et al.*, 1991).

Dans la bibliographie portant sur la régulation génique chez les espèces pérennes en réponse au déficit hydrique, des gènes impliqués dans le métabolisme cellulaire ont été identifiés tels que le gène *PR10* chez le pin maritime, les gènes *P5CS* et *LEA* chez le citrus (Dubos et Plomion, 2001 ; 2003 ; Torres *et al.*, 2007). En général, les études chez les pérennes montrent une régulation génique spécifiques à chaque espèce. Grâce à notre étude, les connaissances sont plus globales et portent sur les gènes impliqués dans la biosynthèse de l'ET et sa signalisation, la signalisation hormonale (JA, IAA..), les systèmes de défense contre les stress abiotiques et le développement racinaire.

### 3.2 Régulation différentielle plus faible de l'abondance relative des transcrits en réponse au déficit hydrique au sein d'un même organe

Les rapports entre l'abondance relative des transcrits au sein d'un même organe pour des plants traités et témoins montrent qu'il y a 10 gènes sur 48 qui sont significativement régulés en réponse au déficit hydrique (**Tableau 6, Figure 7**). Ce nombre peu élevé de gènes peut refléter que soit le déficit hydrique modéré n'entraîne pas une réponse suffisante au niveau des organes, soit que les gènes cibles ne sont pas appropriés à cette étude.

Dans la bibliographie, une *FTSW* de 0,4 est généralement considéré comme un stress modéré (Pellegrino *et al.*, 2005 ; Luquet *et al.*, 2008). Cette *FTSW* induit des réponses physiologiques telles que la fermeture de stomate, la baisse de taux de transpiration, et la production des protéines de défense (Luquet *et al.*, 2008 ; Jacobsen *et al.*, 2009). Pourtant, la définition de l'intensité du stress pour un niveau de *FTSW* dépend de es l'espèce étudiée. Chez la vigne, un



**Figure 8.** Cartographie des ratios entre les abondances relatives de transcrits de plants ayant subi un déficit hydrique et leur témoin dans différents organes chez les somaplants âgés de 7 mois. F. Feuille, T. Tige, RM. Racine moyenne, RFD. Racine fine différenciée, RFA. Racine fine apex, RXF. Racine extra-fine. Les boîtes en rouge signifie une surexpression, en vert signifie une sous-expression, et en orange signifie les valeurs non-significatives.

niveau de  $FTSW=0,4$  est considéré comme un faible déficit hydrique (Payan et Salançon, 2002) ainsi que chez le sorgho (Kholova *et al.*, 2010), alors qu'il est considéré comme un fort stress chez le maïs (Ray *et al.*, 2002 ; Wahbi et Sinclair, 2007).

Chez l'hévéa, le choix du niveau de  $FTSW$  de 0,4 est basé sur une expérience précédente dont les analyses biochimiques montraient une forte augmentation du taux de proline, de la teneur en thiols, en acide ascorbique et en enzymes détoxifiantes (ascorbate peroxydase, glutathion réductase, peroxydases) (Comm. personnelle Christine Sanier, 2010). Ces protéines sont considérées comme des marqueurs d'un état de stress chez les plantes. Les plantes ne montrent un état de stress qu'après une perte en eau de 60% du le sol, ce qui est égal à un niveau  $FTSW$  de 0,4 (Kholova *et al.*, 2010). Dans notre expérience, le matériel a subi une à deux semaines de déshydratation pour atteindre un seuil de  $FTSW$  de 0,4 et puis ce niveau de  $FTSW$  est maintenu pendant une semaine supplémentaire. Toutefois, notre matériel d'étude ne montre pas une fluctuation importante des données physiologiques (conductance stomatique, etc.) après une semaine à une  $FTSW$  de 0,4 (données non montrées, comm. personnelle Christine Sanier, 2010) ce qui pourrait expliquer la faible modulation de l'expression génique.

Les gènes régulés sont impliqués dans différents processus physiologiques chez la plante. Dans les voies de biosynthèse et de signalisation de l'ET, nos résultats semblent logiques par rapport à la cascade de la signalisation éthylénique chez les espèces modèles. La surexpression d'*ACSI* (biosynthèse de l'éthylène est suivie par la même réponse pour *ETR2* (récepteur de l'éthylène) dans les racines fines, et une diminution de l'abondance relative des transcrits des gènes impliqués dans la voie de signalisation tels qu'*EIN2*, *EIN3*, *ERFBarkIVb2*, et *ERFrootIa*. Le gène *ETR2* est un régulateur négatif en amont de ces gènes (Sakai *et al.*, 1998 ; Wuriyanghan *et al.*, 2009).

Par ailleurs, nous avons remarqué que le gène *SAP3bis* n'est pas un marqueur en cas de déficit hydrique chez l'hévéa étant donné son faible niveau d'expression dans les racines fines différenciées. Chez *Arabidopsis*, il a été montré que ce gène est plutôt impliqué dans la réponse au stress salin et froid (Stroher *et al.*, 2009). Cependant, la production des EAO est indiquée par la surexpression du gène *APX2*, l'une des enzymes impliquée dans le cycle glutathion/ascorbate, dans les racines extra-fines. Cette enzyme prend en charge l' $H_2O_2$ , une espèce activée de l'oxygène, et le réduit en  $H_2O$ . Une augmentation d'abondance relative de transcrits du gène *OASTL* est aussi observée dans les feuilles. Cela signifie probablement que

**Tableau 6.** Synthèse de la régulation d'abondance de transcrits chez les groupes de gènes étudiés.

| Groupe des gènes                 | Régulation d'abondance de transcrits |                            |
|----------------------------------|--------------------------------------|----------------------------|
|                                  | Spatiale                             | Déficit hydrique           |
| Biosynthèse de l'ET              | <i>ACSF10, ACO3</i>                  | <i>ACSI</i>                |
| Signalisation de l'ET et du JA   | <i>ETR1, EIN2, ACR</i>               | <i>ETR2, EIN2, SAP3bis</i> |
| Développement racinaire          | <i>IAA/SHY, TIR1</i>                 | -                          |
| Systèmes de détoxification d'EAO | <i>Cu2nSOD, APX2, OASTL</i>          | <i>APX2, OASTL</i>         |
| Diverses métabolismes            | <i>ACR, GS, LTPP</i>                 | <i>ACBP, CaM, CAS2, GS</i> |

la demande en synthèse de glutathion a été perçue ce qui explique la stimulation de la synthèse de cystéine au niveau foliaire.

Le déficit hydrique induit probablement des régulations métaboliques à travers des organes. Dans nos résultats, il est montré une surexpression du gène *ACBP* dans les racines extra-fines, une sous-expression du gène *CaM* dans les feuilles, une sous-expression du gène *CAS2* et *GS* dans les racines moyennes et fines différenciées, ainsi fines apex. Un déficit hydrique affecte la perturbation des parois cellulaires dans laquelle l'ACBP, une protéine de liaison de l'acétyl-coA, est nécessaire pour la synthèse des parois (Suzui *et al.*, 2006). Le gène *GS* codant la glutamine synthétase montre une réponse opposée par rapport à ce qui est connu. Il a été montré que son expression ectopique améliore la résistance des plantes en cas de déficit hydrique sévère (El-Khatib *et al.*, 2004).

Vu que peu de gènes répondent au déficit hydrique, le choix de gènes n'est peut-être pas pertinent. De meilleures cibles seraient des gènes liés à la réponse à un déficit hydrique, par exemple ceux de la signalisation et de la régulation de l'ABA qui est l'un des marqueurs des signaux de contrôle de la fermeture stomatique, les facteurs de transcription de type DREB, ou les gènes codant les aquaporines. Malheureusement, nous n'avons pas pu disposer de ces gènes lors de ce stage. Mais le développement des données *ESTs* d'hévée devrait permettre l'identification d'autres gènes qui seront peut être plus prometteurs.

Nos résultats montrent également que les racines extra-fines ( $\phi < 1\text{mm}$ ) sont très sensibles au déficit hydrique avec une induction de gènes impliqués dans la biosynthèse d'ET, les voies de signalisation, la défense contre le stress oxydatif et le métabolisme (**Figure 8**). Chez les espèces pérennes dicotylédones les plus étudiées (peuplier, pommier, pin, eucalyptus,...), le système racinaire adventif est toujours analysé dans son ensemble (Smolka, 2009) et aucune analyse des racines fines et extra-fines n'est publiée à notre connaissance. Par contre, chez le riz, il a été montré que lors de la mise en place du stress osmotique, la plante développe plus des racines fines ( $\phi < 2\text{mm}$ ) (Jia *et al.*, 2008).

### 3.3 Régulation fonctionnelle au niveau racinaire

L'un des objectifs de notre étude était d'identifier les sites principaux de régulation génique pour une étude plus approfondie du développement des racines en réponse au déficit hydrique.



Parmi les gènes significativement régulés, aucun des gènes impliqués dans le développement racinaire n'est spécifique des racines et n'est régulé par le déficit hydrique. Les résultats d'expression spatiale des gènes du développement racinaire montrent une abondance de transcrits relativement constitutive dans toutes les racines (**Tableau 3, Figure 6**).

A travers une étude bibliographique, nous n'avons pas pu découvrir les tissus racinaires qui apparaissent importants dans une étude fonctionnelle racinaire chez les espèces pérennes. Notre système d'étude révèle que les racines extra-fines sont le site de modifications importantes soit en régulation spatiale par rapport aux autres racines soit en réponse au déficit hydrique. Des gènes significativement régulés tels que l'*ACSI*, *ETR2*, *EIN2*, *APX2*, *ACBP* semblent être des cibles importantes et orienteront la recherche de gènes candidats dans le cadre d'un futur travail sur les racines extra-fines chez l'hévéa par d'une approche transcriptomique.

Ces gènes ont de divers rôles dans de différents cas de stress. L'éthylène est de même impliqué dans le développement racinaire. Le gène *ACSI* est connu pour son rôle de l'induction de développement des racines sous condition de l'hypoxie chez le maïs (Geisler-Lee *et al.*, 2009). L'éthylène est impliqué dans la formation des racines latérales en liaison avec l'auxine chez *Arabidopsis* (Negi *et al.*, 2008), et des poils absorbants (Rahman *et al.*, 2002). D'ailleurs, le gène *ACBP* est fortement régulé en cas de stress métaux par le plomb dans les racines chez l'arabette et le peuplier (Mashkina et Butorina, 2003 ; Xiao *et al.*, 2008)

En conclusion, cette cartographie d'expression génique dans les différents organes de somaplants d'hévéa apporte une connaissance importante pour l'identification de gènes candidats impliqués dans la tolérance au stress hydrique.

## 4 Matériels et méthodes

### 4.1 Matériel végétal

Des plantules du clone PB260, obtenues par embryogenèse somatique avec la lignée CI07069, âgés de 7 mois ont été repotées en pots de 1L dans 340 g de terreau. Deux lots sont constitués : un lot témoin de 3 plantes arrosées régulièrement et maintenus à  $FTSW=1 \pm 10\%$ , un lot de 3 plantes non arrosées. Des mesures de transpiration sont effectuées tous les jours en pesant les plantes, les motifs témoins sont réhydratés en conséquence. La *FTSW* des plantes traitées est suivie de manière journalière et des prélèvements sont effectués pour  $FTSW=0.4$ . Au préalable au calcul de la *FTSW*, la capacité au champ représentant la quantité d'eau retenue maximale (*FC/full capacity*) de chaque pot ainsi que le point de flétrissement (*WP/wilting point*) moyen, doit être calculé.



La *FTSW* est calculé par la formule :  $FTSW = \text{Available Soil Water (ASW)} / \text{Total Transpirable Soil Water (TTSW)}$  où *ASW* égale *SWC (Soil Water Content)-WP* et *TTSW* égale *FC-WP* (Luquet et al., 2008). La quantité de l'eau sous sol (*SWC*) est le poids de pot et de plante mesurée chaque jour.

Des prélèvements chez les témoins sont couplés à ceux des motifs stressés après rétention de la condition de stress pendant 6 jours.

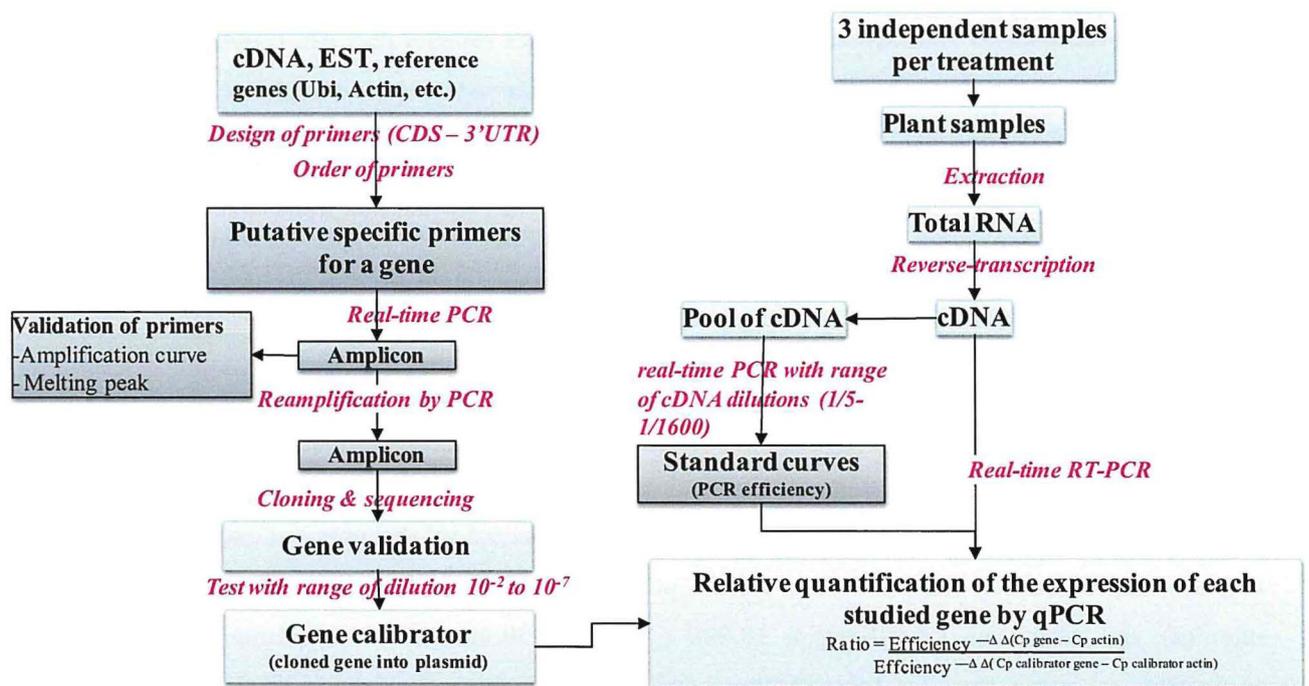
#### 4.2 Prélèvement des échantillons

Les 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 que les parties aériennes (feuilles et écorces), sont prélevées sur un vitroplant. Avant le prélèvement, les racines sont lavées quatre fois dans des bacs remplis de l'eau robinet pendant 30 secondes pour chacun d'eux pour désagréger le terreau. Elles sont ensuite immédiatement plongées dans un tampon 1M phosphate à pH 7 pendant 30 secondes. Les racines sont alors placées sur 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 50 ml rempli de l'azote. Ils sont conservés au congélateur à -80°C jusqu'à l'extraction des ARNs totaux.

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

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.

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. La synthèse d'ADN complémentaires (ADNc) se fait par transcription inverse. Les échantillons d'ARNs (4µg) sont mis en présence de l'amorce (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



**Figure 9.** Etape d'analyse des études de l'expression des gènes par RT-PCR en temps réel (LighCycler 480, Roche).

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 minutes à 42°C. La réaction est par la suite stoppée en disposant les tubes pendant 10 minutes à 70°C. Les ADNc sont passés par PCR classique en utilisant les amorces actives afin de valider la présence des ADNc (**Annexe 1**).

#### 4.4 Préparation des calibrateurs pour analyse de RT-PCR en temps réel

Toutes les étapes de préparation de RT-PCR en temps réel sont montrées dans la **Figure 9**.

##### 4.4.1 Définition des amorces spécifiques des gènes racinaires

Sept gènes identifiés chez l'hévéa sont annotés avec une analyse BLASTx de chaque contig dans le logiciel Geneious Pro ver. 4.8.5. Les amorces sont définies pour l'amplification d'un fragment de 200-220 pb à cheval sur les régions de séquence en 3'-UTR et en partie codante.

##### 4.4.2 Première amplification des amorces par PCR en temps réel

Les amorces sont testées par une approche de PCR en temps réel avec une série de dilutions de mélange des ADNc (feuilles, écorces et racines) : 1/10, 1/20, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320, et 1/640. Les analyses de courbe de fusion et de quantification absolue utilisant la seconde dérivée maximum sont réalisées pour définir les produits choisis à l'étape suivante.

##### 4.4.3 Réamplification par PCR

La réamplification est réalisée par PCR classique afin d'avoir des produits propres sans le SYBRGreen. Les matrices sont choisies d'après le résultat précédent à partir de la plaque PCR en temps réel. Les réactions sont faites avec la *Taq* polymérase thermostable. Le mélange réactionnel (50 µl) contient du tampon de réaction *Taq* 10x, un mélange à 2 mM des différents déoxynucléotides triphosphates (dNTP), 5 µM de mélange des amorces, 1 U/µl d'enzyme, environ 5 ng/µl de matrice et de l'eau stérile. Le protocole d'amplification est constitué d'une dénaturation initiale à 94°C pendant 2 min, puis d'une quarantaine de cycles dénaturation/hybridation/élongation de respectivement 30 sec à 94°C, 45 sec à une température de 58°C, et 45 sec à 72°C. La PCR se termine par une élongation finale à 72°C pendant 10 min. Les produits obtenus sont séparés sur gel d'agarose à 1,5%.

##### 4.4.4 Clonage, transformation, et séquençage

###### 4.4.4.1 Clonage

Les clonages des gènes sont réalisés par le système TOPO TA Cloning® (Invitrogen). Les réactions se font dans un volume total de 6 µl contenant 4 µl de produit PCR, de 1 µl de Salt Solution, et de 1 µl de vecteur TOPO, terminé par incubation à la température ambiante pendant 5 min.



#### 4.4.4.2 Transformation

Au produit de ligation, 50 µl de cellules compétentes DH5α ou 25 µl de TOP10 sont ajoutées, préalablement décongelées dans la glace, suivie par une incubation sur la glace pendant 30 min. Le choc thermique se fait en incubant à 42°C pendant soit 20 sec pour DH5α, soit 30 sec pour TOP10, immédiatement mis sur glace pendant 5 min. Les tubes sont laissés incuber à 37°C pendant 1h30 après un ajout de 250 µl de solution SOC liquide par tube. Sous la hotte bactériologique, 100 µl de bactéries en tube sont étalées sur une boîte de Pétri contenant un milieu LB (25 µl ampicilline à 50 mg/l ; 0,5 mM IPTG ; et 80 µg X-Gal). Les boîtes de Pétri sont incubées à 37°C pendant une nuit afin de l'observer pour les colonies blanches et bleues pâles.

#### 4.4.4.3 Vérification de la présence d'insert par PCR sur colonie

Huit colonies blanches ou bleues pâles par gène sont choisies. La réaction de PCR est préparée avec les amorces M13F-R et M13R-F. Le mélange réactionnel (25 µl) contient du tampon de réaction *Taq* 10x, un mélange à 2 mM des différents déoxynucléotides triphosphates (dNTP), 5 µM de mélange des amorces, 1 U/µl d'enzyme *Taq* polymérase, environ un pique de cellule qui sert comme matrice et de l'eau stérile. Le protocole d'amplification est constitué d'une dénaturation initiale à 94°C pendant 5 min, puis d'une quarantaine de cycles dénaturation/hybridation/élongation de respectivement 30 sec à 94°C, 1 min à une température de 52°C, et 1 min à 72°C. La PCR se termine par une élongation finale à 72°C pendant 7 min. Les produits obtenus sont séparés sur gel d'agarose à 1%.

#### 4.4.4.4 Extraction des plasmides

Les cultures bactériennes sont préparées avec 5 ml de LB liquide et 5 µl d'Ampicilline (1000X) dans un tube de 13 ml, incubées pendant une nuit à 37°C. Les plasmides récupérés par un kit de Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) sont analysés par digestion enzymatique (*EcoRI*). Les plasmides contenant l'insert sont envoyés au séquençage (GATC).

#### 4.4.4.5 Analyse des séquences des produits de PCR

Les séquences de produit PCR obtenues ont été comparées avec celles contenues dans les différentes banques de données grâce au logiciel de recherche et d'alignement BLAST (**Annexe 2**).

#### 4.4.5 Identification des dilutions optimales pour chacun des calibrateurs

Les plasmides récupérés sont testés leur efficacité en PCR à temps réel par une série de dilutions de  $10^{-2}$  jusqu'à  $10^{-10}$  sur une plaque de 96. Le mélange réactionnel (6µl/puit) contient du SYBRGreen, 5 µM de mélange des amorces, environ 2 µl de matrice et de l'eau stérile. Le protocole d'amplification, utilisé par le LightCycler 480 (Roche) est constitué d'une dénaturation initiale à 95°C pendant 15 sec, puis d'une quarantaine de cycles dénaturation/hybridation/élongation de respectivement 20 sec à 95°C, 15 sec à une température de 60°C, et 20 sec à 72°C. La PCR se termine par une cycle de courbe de



fusion de respectivement 5 sec à 95°C, 60 sec à 65°C, et continuent à 95°C, suivi d'un refroidissement à 40°C pendant 30 sec.

Les résultats sont directement analysés dans le logiciel de LightCycler® 480 SV 1.5 pour déterminer l'efficacité des amorces par une courbe standard.

#### 4.5 Analyse d'expression génique par RT-PCR en temps réel

##### 4.5.1 Préparation des plaques

Les plaques de 384 puits ont été préparées dans un volume réactionnel de 6 µl distribué au robot (NX Head 96, Beckman). Les plaques finales viennent de mélange proportionnel des plaques des ADNc et des mélanges réactionnels pour la PCR.

##### 4.5.2 Conditions de PCR

Les conditions de PCR sont : 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. Les données d'expression sont les chiffres normalisés obtenus par le logiciel LightCycler® 480 SW 1.5.

##### 4.5.3 Analyse des données par test statistique

Les données de trois répétitions biologiques issus des traitements et leurs témoins spécifiques ont ensuite été traitées sur un tableau Excel pour calculer les moyennes et les écart-types pour chaque traitement, les significativités entre les valeurs quantitatives (les chiffres d'expression) et qualitatives (des différents organes) par test Newman-Keuls et les rapports traitement/témoin et les p-Value des données deux-à-deux (traitement / témoin) calculées grâce au test de Fischer.



## 5 Références

- Annerose DJM (1991) Caractérisation de la sécheresse agronomique en zone semi-aride (II) : Evaluation des formes de sécheresse agronomique de l'arachide au Sénégal par simulation du bilan hydrique de la culture. *Oléagineux* **46**: 61-67
- Bae H, Kim SH, Kim MS, Sicher RC, Lary D, Strem MD, Natarajan S, Bailey BA (2008) The drought response of *Theobroma cacao* (cacao) and the regulation of genes involved in polyamine biosynthesis by drought and other stresses. *Plant Physiol Biochem* **46**: 174-188
- Barry CS, Blume B, Bouzayen M, Cooper W, Hamilton AJ, Grierson D (1996) Differential expression of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase gene family of tomato. *Plant J* **9**: 525-535
- Birnbaum K, Shasha DE, Wang JY, Jung JW, Lambert GM, Galbraith DW, Benfey PN (2003) A Gene Expression Map of the Arabidopsis Root. *Science* **302**: 1956-1960
- Boualem A, Laporte P, Jovanovic M, Laffont C, Plet J, Combier J-P, Niebel A, Crespi M, Frugier F (2008) MicroRNA166 controls root and nodule development in *Medicago truncatula*. *The Plant Journal* **54**: 876-887
- Brosché M, Vinocur B, Alato ER, Lamminmaki A, Teichmann T, Ottow EA, Djilianov D, Afif D, Bogeat-Triboulot MB, Alltman A, Polle A, Dreyer E, Rudd S, Paulin L, Auvinen P, Kangasjarvi J (2005) Gene expression and metabolite profiling of *Populus euphratica* growing in the Negev desert. *Genome Biol.* **6**: R101
- Callaway RM, Mahall BE (1996) Variation in Leaf Structure and Function in *Quercus douglasii* Trees Differing in Root Architecture and Drought History. *Int. J. Plant. Sci.* **157**: 129-135
- Carron M-P, Nurhaimi-Haris, Sumaryono, Clément-Demange A, Sumarmadji, Granet F, Keli, Montoro P (2008) The rejuvenated "bi-clones" in rubber tree - a new varietal type to take up the challenges of the future ? *In* IRRDB Natural Rubber Conference, Kuala Lumpur, Malaysia
- Carron M-P, Nurhaimi-Haris, Sumaryono, Sumarmadji, Granet F, Keli J, Montoro P (2008) The rootstock clones in rubber tree: a new varietal type toward the rejuvenated bi-clone. *In* IRRDB Workshop on Rubber Plant Materials, Bogor, Indonesia
- 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
- Champoux MC, Wang G, Sarkarung S, Mackill DJ, O'Toole JC, Huang N, McCouch SR (1995) Locating genes associated with root morphology and drought avoidance in rice via linkage to molecular markers. *TAG Theoretical and Applied Genetics* **90**: 969-981
- Coutts M (1983) Root architecture and tree stability. *Plant and Soil* **71**: 171-188
- DaMatta FM, Ramalho JDC (2006) Impacts of drought and temperature stress on coffee physiology and production: a review. *Brazilian Journal of Plant Physiology* **18**: 55-81
- Devakumar AS, Gawai Prakash P, Sathik MBM, Jacob J (1999) Drought alters the canopy architecture and micro-climate of *Hevea brasiliensis* trees. *Trees - Structure and Function* **13**: 161-167
- Dinneny JR, Long TA, Wang JY, Jung JW, Mace D, Pointer S, Barron C, Brady SM, Schiefelbein J, Benfey PN (2008) Cell Identity Mediates the Response of Arabidopsis Roots to Abiotic Stress. *Science* **320**: 942-945
- Dubos C, Plomion C (2001) Drought differentially affects expression of a PR-10 protein, in needles of maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.) seedlings. *J. Exp. Bot.* **52**: 1143-1144
- Dubos C, Plomion C (2003) Identification of water-deficit responsive genes in maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.) roots. *Plant Molecular Biology* **51**: 249-262
- El-Khatib RT, Hamerlynck EP, Gallardo F, Kirby EG (2004) Transgenic poplar characterized by ectopic expression of a pine cytosolic glutamine synthetase gene exhibits enhanced tolerance to water stress. *Tree Physiol* **24**: 729-736
- Fitter AH (1991) The characteristics and functions of root systems. *In* Y Waisel, U Kafkafi, A Eshel, eds, *Plant Roots : The Hidden Half*. Marcem Dekker Inc, New York, pp 3-25
- Frankowski K, Keszy J, Kopcewicz J (2007) [Regulation of ethylene biosynthesis in plants]. *Postepy Biochem* **53**: 66-73
- Gallie DR, Young TE (2004) The ethylene biosynthetic and perception machinery is differentially expressed during endosperm and embryo development in maize. *Mol Genet Genomics* **271**: 267-281



- Geisler-Lee J, Caldwell C, Gallie DR (2009) Expression of the ethylene biosynthetic machinery in maize roots is regulated in response to hypoxia. *J. Exp. Bot.*: erp362
- Guo H-S, Xie Q, Fei J-F, Chua N-H (2005) microRNA164 Directs NAC1 mRNA Cleavage to Downregulate Auxin Signals for Lateral Root Development. *Plant Cell*: tpc.105.030841
- Gutierrez L, Bussell JD, Pacurar DI, Schwambach J, Pacurar M, Bellini C (2009) Phenotypic Plasticity of Adventitious Rooting in Arabidopsis Is Controlled by Complex Regulation of AUXIN RESPONSE FACTOR Transcripts and MicroRNA Abundance. *Plant Cell* **21**: 3119-3132
- Harberd NP, Belfield E, Yasumura Y (2009) The Angiosperm Gibberellin-GID1-DELLA Growth Regulatory Mechanism: How an "Inhibitor of an Inhibitor" Enables Flexible Response to Fluctuating Environments. *Plant Cell* **21**: 1328-1339
- Hasegawa PM, Bressan RA, Zhu J-K, Bohnert HJ (2000) Plant Cellular And Molecular Responses To High Salinity. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **51**: 463-499
- Huang BR, Duncan R (1996) Root growth, water uptake and vitality in relation to turfgrass drought resistance. *Plant Physiology* **111**
- Jacobsen S-E, Liu F, Jensen CR (2009) Does root-sourced ABA play a role for regulation of stomata under drought in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Scientia Horticulturae* **122**: 281-287
- Jia Y-b, Yang X-e, Feng Y, Jilani G (2008) Differential response of root morphology to potassium deficient stress among rice genotypes varying in potassium efficiency. *Journal of Zhejiang University - Science B* **9**: 427-434
- Jourdan C (1995) Modelisation de l'architecture et du développement du système racinaire du palmier à l'huile. Université Montpellier II, Montpellier
- Kholova J, Hash CT, Kakker A, Kocova M, Vadez V (2010) Constitutive water-conserving mechanisms are correlated with the terminal drought tolerance of pearl millet [*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.]. *J. Exp. Bot.* **61**: 369-377
- Kreps JA, Wu Y, Chang H-S, Zhu T, Wang X, Harper JF (2002) Transcriptome Changes for Arabidopsis in Response to Salt, Osmotic, and Cold Stress. *Plant Physiol.* **130**: 2129-2141
- Kuswanhadi, Leclercq J, Rio M, Tregear J, Ducamp-Collin MN, Montoro P (In press) Isolation of Three Members of The Multigene Family Encoding ACC Oxidases in *Hevea brasiliensis* and Investigation of Their Responses to Ethylene Stimulation and Wounding. *Journal of Rubber Research*
- Laporte P (2009) Rôle des ARN non-codants pour des protéines (npcRNAs) dans la régulation de l'architecture de la racine. Université de Paris XI, Paris
- 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
- Le Roux Y, Pages L (1996) [Geotropic reaction of different types of roots in *Hevea brasiliensis*]. *Can J Bot* **74**: 1910-1918
- Le Roux Y, Pagès L (1994) Développement et polymorphisme racinaires chez de jeunes semis d'hévéa (*Hevea brasiliensis*). *Can. J. Bot.* **72**: 924-932
- Li S-W, Xue L, Xu S, Feng H, An L (2009) Mediators, Genes and Signaling in Adventitious Rooting. *The Botanical Review* **75**: 230-247
- Liu H, Wang S, Yu X, Yu J, He X, Zhang S, Shou H, Wu P (2005) ARL1, a LOB-domain protein required for adventitious root formation in rice. *The Plant Journal* **43**: 47-56
- Luquet D, Clément-Vidal A, Fabre D, This D, Sonderegger N (2008) Orchestration of transpiration, growth and carbohydrate dynamics in rice during a dry-down cycle. *Functional Plant Biology* **35**: 689-704
- Mashkina OS, Butorina AK (2003) Genetic Engineering of Forest Woody Plants. *Russian Journal of Genetics* **39**: 241-248
- 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



- Negi S, Ivanchenko MG, Muday GK (2008) Ethylene regulates lateral root formation and auxin transport in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **55**: 175-187
- Nurhaimi-Haris, Siswanto, Sumarmadji, Hadi H, Tistama R, Carron MP (2006) Possibility of microcutting application for propagation of clonal rootstocks on rubber tree. *In National Symposium of Rubber Cultivation, IRRI Medan - Indonesia*
- Oldeman RAA (1974) L'architecture de la forêt guyanaise. *In Mémoire ORSTOM, Paris*, p 204
- Payan JC, Salançon E (2002) Utilisation d'un modèle de bilan hydrique comme outil d'aide à la gestion de la contrainte hydrique au vignoble. *In VIèmes Rencontres Rhodaniennes, évolution des techniques et productions d'AOC en Vallée du Rhône*, imp., Institut Rhodanien, pp 20-29
- Pellegrino A, Lebon E, Voltz M, Wery J (2005) Relationships between plant and soil water status in vine (*Vitis vinifera* L.). *Plant and Soil* **266**: 129-142
- Petruzzelli L, Coraggio I, Leubner-Metzger G (2000) Ethylene promotes ethylene biosynthesis during pea seed germination by positive feedback regulation of 1-aminocyclo-propane-1-carboxylic acid oxidase. *Planta* **211**: 144-149
- Putranto RA (2009) Etude de la régulation spatiale de l'expression des gènes intervenant dans la biosynthèse de l'éthylène et dans les systèmes de détoxification des espèces activées de l'oxygène chez *Hevea brasiliensis*. Université Montpellier 2, Montpellier
- 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
- Ray JD, Gesch RW, Sinclair TR, Hartwell Allen L (2002) The effect of vapor pressure deficit on maize transpiration response to a drying soil. *Plant and Soil* **239**: 113-121
- Sakai H, Hua J, Chen QG, Chang C, Medrano LJ, Bleecker AB, Meyerowitz EM (1998) ETR2 is an ETR1-like gene involved in ethylene signaling in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 5812-5817
- Schachtman DP, Goodger JQD (2008) Chemical root to shoot signaling under drought. *Trends in Plant Science* **13**: 281-287
- Seki M, Narusaka M, Ishida J, Nanjo T, Fujita M, Oono Y, Kamiya A, Nakajima M, Enju A, Sakurai T, Satou M, Akiyama K, Taji T, Yamaguchi-Shinozaki K, Carninci P, Kawai J, Hayashizaki Y, Shinozaki K (2002) Monitoring the expression profiles of 7000 *Arabidopsis* genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. *The Plant Journal* **31**: 279-292
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2007) Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *J. Exp. Bot.* **58**: 221-227
- Smolka A (2009) Understanding of Molecular Mechanisms and Improvement of Adventitious Root Formation in Apple. Doctoral Thesis. Swedish University of Agricultural Sciences
- Smolka A, Welander M, Olsson P, Holefors A, Zhu L-H (2009) Involvement of the ARRO-1 gene in adventitious root formation in apple. *Plant Science* **177**: 710-715
- Sossountzov L, Ruiz-Avila L, Vignols F, Jolliot A, Arondel V, Tchang F, Grosbois M, Guerbette F, Miginiac E, Delseny M, et al. (1991) Spatial and temporal expression of a maize lipid transfer protein gene. *Plant Cell* **3**: 923-933
- Stroher E, Wang X-J, Roloff N, Klein P, Husemann A, Dietz K-J (2009) Redox-Dependent Regulation of the Stress-Induced Zinc-Finger Protein SAP12 in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant* **2**: 357-367
- Suzui N, Nakamura S-i, Fujiwara T, Hayashi H, Yoneyama T (2006) A putative acyl-CoA-binding protein is a major phloem sap protein in rice (*Oryza sativa* L.). *J. Exp. Bot.* **57**: 2571-2576
- Tang X, Woodson WR (1996) Temporal and Spatial Expression of 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate Oxidase mRNA following Pollination of Immature and Mature Petunia Flowers. *Plant Physiol* **112**: 503-511
- Thomas P, Lee MM, Shciefelbein J (2003) Molecular identification of proline-rich protein genes induced during root formation in grape (*Vitis vinifera* L.) stem cuttings. *Plant, Cell & Environment* **26**: 1497-1504
- Thomashow MF (1999) Plant Cold Acclimation : Freezing Tolerance Genes and Regulatory Mechanisms. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **50**: 571-599



- Torres GAM, Gimenes MA, Rosa Jr. VEd, Quecini V (2007) Identifying water stress-response mechanisms in citrus by in silico transcriptome analysis. *Genetics and Molecular Biology* **30**: 888-905
- Ubeda-Tomás S, Federici F, Casimiro I, Beemster GTS, Bhalerao R, Swarup R, Doerner P, Haseloff J, Bennett MJ (2009) Gibberellin Signaling in the Endodermis Controls Arabidopsis Root Meristem Size. *Plant Cell* **19**: 1194-1199
- Ubeda-Tomas S, Swarup R, Coates J, Swarup K, Laplaze L, Beemster GTS, Hedden P, Bhalerao R, Bennett MJ (2008) Root growth in Arabidopsis requires gibberellin/DELLA signalling in the endodermis. *Nat Cell Biol* **10**: 625-628
- Umezawa T, Fujita M, Fujita Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2006) Engineering drought tolerance in plants: discovering and tailoring genes to unlock the future. *Current Opinion in Biotechnology* **17**: 113-122
- Vadez V, Krishnamurthy L, Kashiwagi J, Kholova J, Devi JM, Sharma KK (2007) Exploiting the functionality of root systems for dry, saline, and nutrient deficient environments in a changing climate. *SAT eJournal* **4**: 1-55
- Vinocur B, Altman A (2005) Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. *Current Opinion in Biotechnology* **16**: 123-132
- Wahbi A, Sinclair TR (2007) Transpiration response of Arabidopsis, maize, and soybean to drying of artificial and mineral soil. *Environmental and Experimental Botany* **59**: 188-192
- Wang J-W, Wang L-J, Mao Y-B, Cai W-J, Xue H-W, Chen X-Y (2005) Control of Root Cap Formation by MicroRNA-Targeted Auxin Response Factors in Arabidopsis. *Plant Cell* **17**: 2204-2216
- Wuriyangan H, Zhang B, Cao W-H, Ma B, Lei G, Liu Y-F, Wei W, Wu H-J, Chen L-J, Chen H-W, Cao Y-R, He S-J, Zhang W-K, Wang X-J, Chen S-Y, Zhang J-S (2009) The Ethylene Receptor ETR2 Delays Floral Transition and Affects Starch Accumulation in Rice. *Plant Cell: tpc*.108.065391
- Xiao S, Gao W, Chen Q-F, Ramalingam S, Chye M-L (2008) Overexpression of membrane-associated acyl-CoA-binding protein ACBP1 enhances lead tolerance in Arabidopsis. *The Plant Journal* **54**: 141-151
- Xiong L, Schumaker KS, Zhu J-K (2002) Cell Signaling during Cold, Drought, and Salt Stress. *Plant Cell* **14**: S165-183
- Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2005) Organization of cis-acting regulatory elements in osmotic- and cold-stress-responsive promoters. *Trends in Plant Science* **10**: 88-94
- Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2006) Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. *Annual Review of Plant Biology* **57**: 781-803
- Zhang JZ (2003) Overexpression analysis of plant transcription factors. *Current Opinion in Plant Biology* **6**: 430-440
- Zhao B, Liang R, Ge L, Li W, Xiao H, Lin H, Ruan K, Jin Y (2007) Identification of drought-induced microRNAs in rice. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **354**: 585-590
- Zhu J-K (2002) Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Biology* **53**: 247-273



## 6 Annexes

### Annexe 1. Récapitulatif de rendements d'ARN de somaplants témoins et traités.

| Plantes |         |        |    | Traitement      |    |          |          | Prélèvement |       | Extraction |             |            |      | Contrôles |               |              |              |                |            | Contrôle de DNase |       | Contrôle d'ADNc |            |    |            |
|---------|---------|--------|----|-----------------|----|----------|----------|-------------|-------|------------|-------------|------------|------|-----------|---------------|--------------|--------------|----------------|------------|-------------------|-------|-----------------|------------|----|------------|
| Clone   | Agè     | Organe | N° | Type            | N° | Duration | Effectif | Date        | Heure | Date       | N° de boîte | Weight (g) | Tube | Vol (µl)  | Conc. (µg/µl) | Rdt (µg/gMF) | Ratio260/280 | Electrophorèse | PCR actine | gDNA              | DNase | Conc (µg/µl)    | PCR actine | RT | PCR actine |
| PB260   | 7 mois  | F      | 41 | Témoin          | 1  | FTSW 1   | 3        | 30.04.10    | 10h   | 05.05.10   | RNA Riza    | 1,39       | 570  | 100       | 3,418         | 245,86       | 1,890        | OK             | OK         | OUI               | OK    | 0,2036          | OK         | OK | OK         |
| PB260   | 7 mois  | T      | 41 | Témoin          | 1  | FTSW 1   | 3        | 30.04.10    | 10h   | 05.05.10   | RNA Riza    | 1,22       | 571  | 50        | 1,252         | 51,30        | 1,752        | OK             | OK         | OUI               | OK    | 0,21216         | OK         | OK | OK         |
| PB260   | 7 mois  | RM     | 41 | Témoin          | 1  | FTSW 1   | 3        | 30.04.10    | 10h   | 05.05.10   | RNA Riza    | 1,31       | 572  | 50        | 0,461         | 17,60        | 1,751        | OK             | OK         | NON               |       | 0,461           | OK         | OK | OK         |
| PB260   | 7 mois  | RFD    | 41 | Témoin          | 1  | FTSW 1   | 3        | 30.04.10    | 10h   | 05.05.10   | RNA Riza    | 1,19       | 573  | 50        | 2,192         | 92,10        | 1,772        | OK             | OK         | OUI               | OK    | 0,26394         | OK         | OK | OK         |
| PB260   | 7 mois  | RFA    | 41 | Témoin          | 1  | FTSW 1   | 3        | 30.04.10    | 10h   | 05.05.10   | RNA Riza    | 0,33       | 574  | 100       | 0,764         | 231,65       | 1,809        | OK             | OK         | NON               |       | 0,76445         | OK         | OK | OK         |
| PB260   | 7 mois  | RXF    | 41 | Témoin          | 1  | FTSW 1   | 3        | 30.04.10    | 10h   | 05.05.10   | RNA Riza    | 1,55       | 575  | 50        | 3,179         | 102,55       | 1,561        | OK             | OK         | OUI               | OK    | 0,26634         | OK         | OK | OK         |
| PB260   | 7 mois  | F      | 60 | Témoin          | 1  | FTSW 1   | 4        | 30.05.10    | 10h   | 17.05.10   | RNA Riza    | 1,96       | 600  | 100       | 3,135         | 159,93       | 1,764        | OK             | OK         | OUI               | OK    | 0,24416         | OK         | OK | OK         |
| PB260   | 7 mois  | T      | 60 | Témoin          | 1  | FTSW 1   | 4        | 30.05.10    | 10h   | 17.05.10   | RNA Riza    | 1,73       | 601  | 50        | 1,735         | 50,14        | 1,752        | OK             | OK         | OUI               | OK    | 0,18128         | OK         | OK | OK         |
| PB260   | 7 mois  | RM     | 60 | Témoin          | 1  | FTSW 1   | 4        | 30.05.10    | 10h   | 17.05.10   | RNA Riza    | 1,79       | 602  | 50        | 1,3185        | 36,83        | 1,708        | OK             | OK         | OUI               | OK    | 0,20841         | OK         | OK | OK         |
| PB260   | 7 mois  | RFD    | 60 | Témoin          | 1  | FTSW 1   | 4        | 30.05.10    | 10h   | 17.05.10   | RNA Riza    | 1,41       | 603  | 50        | 1,8369        | 65,14        | 1,776        | OK             | OK         | OUI               | OK    | 0,19509         | OK         | OK | OK         |
| PB260   | 7 mois  | RFA    | 60 | Témoin          | 1  | FTSW 1   | 4        | 30.05.10    | 10h   | 17.05.10   | RNA Riza    | 0,18       | 604  | 50        | 0,3369        | 93,58        | 1,737        | OK             | OK         | OUI               | OK    | 0,16883         | OK         | OK | OK         |
| PB260   | 7 mois  | RXF    | 60 | Témoin          | 1  | FTSW 1   | 4        | 30.05.10    | 10h   | 17.05.10   | RNA Riza    | 1,84       | 605  | 50        | 1,0257        | 27,87        | 1,707        | OK             | OK         | OUI               | OK    | 0,18597         | OK         | OK | OK         |
| PB260   | 12 mois | F      | 7  | Témoin          | 1  | FTSW 1   | 5        | 12.03.09    | 13h   | 19.03.09   | 6           | 1,36       | 494  | 100       | 4,622         | 339,85       | 1,756        | OK             | OK         | NON               |       |                 |            | OK | OK         |
| PB260   | 12 mois | T      | 7  | Témoin          | 1  | FTSW 1   | 5        | 12.03.09    | 13h   | 19.03.09   | 6           | 0,94       | 495  | 100       | 2,041         | 217,13       | 1,822        | OK             | OK         | NON               |       |                 |            | OK | OK         |
| PB260   | 12 mois | RM     | 7  | Témoin          | 1  | FTSW 1   | 5        | 12.03.09    | 13h   | 19.03.09   | 6           | 1,34       | 490  | 50        | 0,385         | 14,37        | 1,750        | OK             | OK         | NON               |       |                 |            | OK | OK         |
| PB260   | 12 mois | RFD    | 7  | Témoin          | 1  | FTSW 1   | 5        | 12.03.09    | 13h   | 19.03.09   | 6           | 1,28       | 491  | 100       | 1,948         | 152,19       | 1,765        | OK             | OK         | NON               |       |                 |            | OK | OK         |
| PB260   | 12 mois | RFA    | 7  | Témoin          | 1  | FTSW 1   | 5        | 12.03.09    | 13h   | 19.03.09   | 6           | 0,17       | 492  | 50        | 1,250         | 367,65       | 1,671        | OK             | OK         | NON               |       |                 |            | OK | OK         |
| PB260   | 12 mois | RXF    | 7  | Témoin          | 1  | FTSW 1   | 5        | 12.03.09    | 13h   | 19.03.09   | 6           | 1,27       | 493  | 50        | 2,844         | 111,97       | 1,749        | OK             | OK         | NON               |       |                 |            | OK | OK         |
| PB260   | 7 mois  | F      | 19 | Stress hydrique | 2  | FTSW 0,4 | 1        | 04.05.10    | 10h   | 06.05.10   | RNA Riza    | 1,62       | 576  | 100       | 5,014         | 309,49       | 1,951        | OK             | OK         | OUI               | OK    | 0,27002         | OK         | OK | OK         |
| PB260   | 7 mois  | T      | 19 | Stress hydrique | 2  | FTSW 0,4 | 1        | 04.05.10    | 10h   | 06.05.10   | RNA Riza    | 1,45       | 583  | 50        | 0,770         | 26,54        | 1,743        | OK             | OK         | NON               |       | 0,76956         | OK         | OK | OK         |
| PB260   | 7 mois  | RM     | 19 | Stress hydrique | 2  | FTSW 0,4 | 1        | 04.05.10    | 10h   | 06.05.10   | RNA Riza    | 1,21       | 584  | 50        | 0,226         | 9,34         | 1,675        | OK             | OK         | NON               |       | 0,22605         | OK         | OK | OK         |
| PB260   | 7 mois  | RFD    | 19 | Stress hydrique | 2  | FTSW 0,4 | 1        | 04.05.10    | 10h   | 06.05.10   | RNA Riza    | 1,41       | 585  | 50        | 2,559         | 90,75        | 1,893        | OK             | OK         | OUI               | OK    | 0,20861         | OK         | OK | OK         |
| PB260   | 7 mois  | RFA    | 19 | Stress hydrique | 2  | FTSW 0,4 | 1        | 04.05.10    | 10h   | 06.05.10   | RNA Riza    | 0,26       | 586  | 100       | 0,640         | 246,01       | 1,745        | OK             | OK         | OUI               | OK    | 0,22188         | OK         | OK | OK         |
| PB260   | 7 mois  | RXF    | 19 | Stress hydrique | 2  | FTSW 0,4 | 1        | 04.05.10    | 10h   | 06.05.10   | RNA Riza    | 1,55       | 587  | 100       | 1,258         | 81,15        | 1,836        | OK             | OK         | OUI               | OK    | 0,23918         | OK         | OK | OK         |
| PB260   | 7 mois  | F      | 47 | Stress hydrique | 2  | FTSW 0,4 | 2        | 07.05.10    | 10h   | 10.05.10   | RNA Riza    | 1,70       | 588  | 100       | 3,924         | 230,85       | 1,817        | OK             | OK         | OUI               | OK    | 0,29031         | OK         | OK | OK         |
| PB260   | 7 mois  | T      | 47 | Stress hydrique | 2  | FTSW 0,4 | 2        | 07.05.10    | 10h   | 10.05.10   | RNA Riza    | 1,55       | 589  | 50        | 2,711         | 87,46        | 1,200        | OK             | OK         | OUI               | OK    | 0,54742         | OK         | OK | OK         |
| PB260   | 7 mois  | RM     | 47 | Stress hydrique | 2  | FTSW 0,4 | 2        | 07.05.10    | 10h   | 10.05.10   | RNA Riza    | 1,57       | 590  | 50        | 1,247         | 39,70        | 1,653        | OK             | OK         | OUI               | OK    | 0,24584         | OK         | OK | OK         |
| PB260   | 7 mois  | RFD    | 47 | Stress hydrique | 2  | FTSW 0,4 | 2        | 07.05.10    | 10h   | 10.05.10   | RNA Riza    | 0,96       | 591  | 50        | 1,173         | 61,11        | 1,824        | OK             | OK         | OUI               | OK    | 0,22518         | OK         | OK | OK         |
| PB260   | 7 mois  | RFA    | 47 | Stress hydrique | 2  | FTSW 0,4 | 2        | 07.05.10    | 10h   | 10.05.10   | RNA Riza    | 0,16       | 592  | 50        | 0,161         | 50,44        | 1,890        | OK             | OK         | NON               |       | 0,1614          | OK         | OK | OK         |
| PB260   | 7 mois  | RXF    | 47 | Stress hydrique | 2  | FTSW 0,4 | 2        | 07.05.10    | 10h   | 10.05.10   | RNA Riza    | 1,84       | 593  | 100       | 1,265         | 68,77        | 1,754        | OK             | OK         | OUI               | OK    | 0,17685         | OK         | OK | OK         |
| PB260   | 7 mois  | F      | 6  | Stress hydrique | 2  | FTSW 0,4 | 3        | 10.05.10    | 10h   | 11.05.10   | RNA Riza    | 1,72       | 594  | 100       | 2,832         | 164,67       | 1,746        | OK             | OK         | OUI               | OK    | 0,21378         | OK         | OK | OK         |
| PB260   | 7 mois  | T      | 6  | Stress hydrique | 2  | FTSW 0,4 | 3        | 10.05.10    | 10h   | 11.05.10   | RNA Riza    | 1,69       | 595  | 50        | 2,053         | 60,75        | 1,629        | OK             | OK         | OUI               | OK    | 0,2411          | OK         | OK | OK         |
| PB260   | 7 mois  | RM     | 6  | Stress hydrique | 2  | FTSW 0,4 | 3        | 10.05.10    | 10h   | 11.05.10   | RNA Riza    | 1,30       | 596  | 50        | 0,276         | 10,61        | 1,888        | OK             | OK         | NON               |       | 0,27573         | OK         | OK | OK         |
| PB260   | 7 mois  | RFD    | 6  | Stress hydrique | 2  | FTSW 0,4 | 3        | 10.05.10    | 10h   | 11.05.10   | RNA Riza    | 1,22       | 597  | 50        | 2,302         | 94,34        | 1,852        | OK             | OK         | OUI               | OK    | 0,25837         | OK         | OK | OK         |
| PB260   | 7 mois  | RFA    | 6  | Stress hydrique | 2  | FTSW 0,4 | 3        | 10.05.10    | 10h   | 11.05.10   | RNA Riza    | 0,31       | 598  | 50        | 1,757         | 283,42       | 1,730        | OK             | OK         | OUI               | OK    | 0,19011         | OK         | OK | OK         |
| PB260   | 7 mois  | RXF    | 6  | Stress hydrique | 2  | FTSW 0,4 | 3        | 10.05.10    | 10h   | 11.05.10   | RNA Riza    | 1,22       | 599  | 100       | 1,267         | 103,84       | 1,653        | OK             | OK         | OUI               | OK    | 0,20612         | OK         | OK | OK         |



**Annexe 2.** Les séquences des fragments des gènes du développement racinaire chez *Hevea brasiliensis*, clonés dans un plasmide TOPO TA.

| Nom de séquences  | Validation |
|---|------------|
| <p>&gt;IAA/SHY-9-M13-FP<br/> TGGATGCTTGGTGGTATGTTTCCTTGGAAAGATGTTACCGACTCTTGTAGGAGGTTGAGGATTATGAAAAGTTC<br/> AGAGGCAATTGGCCTAGCCCCAAGAGCCATGGAGAAGTGTAAGTGCCTGCAACTAGTGAGATAGTGTGCTATC<br/> AACAGATCAAATCCACTGTCTGGGCAAATGATGA</p>                                    | OUI        |
| <p>&gt;HB8-17-M13-FP<br/> TGTAGCCATGGCAACCCTCTGTACAGAGGAAATCACACTGCGTACATATTGACGAGCCATGGTGGCAACATTAT<br/> CCTGTAAATTGCTCTCAAAGGGAAGTCAAAGGCAATAGTCAAGACTGATCGTGTACTATGAGATGATGACAC<br/> ATCTCCAGCAGCATGATTTGTTGCAGGACCCACT</p>  | OUI        |
| <p>&gt;SLR2-27-M13-FP<br/> CCACCTTAAAAGCACAGACACATCCAAAAGAAACACCATTTTGTGTTGCTTGCCTAGTGCCTTGTGCTACCG<br/> ATAGCCTTCTGGATATGAAGACTAAATATAGAGGAATCTAGCACAGTATACCGCAGCTTGCAAGCTGAAATTT<br/> AAGTGTGGTTTGTCTATATCAGGTTCTGCTTGTGCTTCTCCATAGCTCTTGGTGCAAGTCCAA</p>           | OUI        |
| <p>&gt;TIR1-34-M13-FP<br/> CGCCTTTCAGTGTGAGGTCCTCACTGATCGTGTGTTTGTGAGTACATTGGAACACATGCCAAAAAACTGGAGAT<br/> GCTTTCGTAGCTTTTGTGCTGGAGATAGTATCTGGACTCCATCATGTGCTGTATGGGTGTGAAAACCTTCGCAA<br/> ACTAGAGATTGAGATTGTCCGTTTGGGGACAAGGCTCTTTTGGCCAATGCTGCAAAGCTGGAGACAATGA</p> | OUI        |
| <p>&gt;SHR-35-M13-FP<br/> AACAGTGCTAAACCCACATGCATGCATCCGTGCAGACCAGCGCGTGGCCGTTTCCCGCCGTTCTATACAGTCGG<br/> ACGGCGAACATGCCACCAAGTCAACTATGGCACGTCTGCAGTCTCCCTAGCATCAACCTTTCGTTGCTTGTTC<br/> TTGAAAAGCTCTTCCAATGACTCAAATAAACCCATAACCATCTCAAGCATTCTTGAAAACCCCTTACGAA</p>   | OUI        |
| <p>&gt;RGA-58-M13-RP<br/> GAAATTCGCCCATTTACAGCTAATCAAGCAATCTTGAAGCTTTTACTACTGCAAGTAGAGTTCATGTGATCG<br/> ATTCGGTCTGAAGCAGGGGATGCAGTGGCCGGCACTAATGCAAGCGCTTGCTTTACGCCAGGTGGGCCGCCG<br/> GCTTCCGTTTAAACCGAATTGGTCCACCGCAGCCTAACAAACCCGATGCTT</p>                         | OUI        |
| <p>&gt;RAV1.5-77-M13-FP<br/> TTAGGCAAGTGCTGGAGGTTGAGGATTCATATTGGAGCAGCAGTCAAAGCTATGTATTGACAAAAGGGTGGGA<br/> GCAGGTATGTGAAGGAGAAGCAACTCGATGCAGGCGATGTCGTTTCAATTTGAACGGCACCGTACGGAAGGTGA<br/> GAGGCTGTTTATAGGGTGGAGGAGAAGAGGAGATAACAGCAGCAGTGGGGT</p>                   | OUI        |

1947  
1948  
1949

1950