

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

RÔLE DEL'AUXINE DANS L'ARRÊT DE CROISSANCE RACINAIRE CAUSÉ
PAR L'ALUMINIUM

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR

NICOLAS BESNIER

JUIN 2007

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Merci tout d'abord au Dr. Mario Houde pour m'avoir permis de faire une maîtrise dans son laboratoire, pour son support et pour ses conseils au cours de ce projet.

Merci à toute l'équipe du laboratoire pour leur aide tout au long de ma maîtrise.

Merci à l'équipe du laboratoire du Dr. Fathey Sarhan

Merci au Dr Normand Chevrier pour l'entretien des variétés isogéniques de blé.

Merci à mes parents Yves et Marie-Pierre pour leur support et leur affection durant toutes ces années. Merci aussi à ma grande sœur Val et mes deux frangins Sylvain et Vincent.

Merci à Manon, sans qui je ne serais jamais venu au Canada. Merci pour ton soutien et pour tous les moments partagés...

Merci à tous mes amis de Montréal, en particulier à Isa, Julien, Lucie, Chloé, Kadia et Émilie. Votre amitié, votre aide et votre soutien m'ont permis de tenir.

Merci à mes irréductibles amis bretons Mulot, Kimi, Wann et Typhaine...loin des yeux, près du cœur!

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES	vi
LISTE DES TABLEAUX	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS ET ACRONYMES	ix
LISTE DES SYMBOLES	xi
RÉSUMÉ	xiii
1. INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
2. ÉTAT DES CONNAISSANCES	3
2.1 Spéciation de l'aluminium	3
2.2 Mécanismes de toxicité de l'aluminium	4
2.2.1 Cibles et symptômes	4
2.2.2 Signalisation et transport membranaire	5
2.2.3 Cytosquelette	8
2.3 Tolérance à l'aluminium	9
2.3.1 Aspects génétiques et moléculaires	9
2.3.2 Expression de la tolérance	11
2.3.3 Activités redox dans les pointes de racines	12
2.4 L'auxine	13
2.4.1 Le métabolisme de l'auxine dans les pointes de racines	13
2.4.2 Expression génétique en réponse à l'auxine	14
2.4.2.1 Expression et régulation des gènes induits en réponse à l'auxine	14
2.4.2.2 Transduction du signal en réponse à l'auxine	18
2.4.3 Le transport de l'auxine dans les racines	18
2.4.3.1 Transport polaire et non-polaire	18
2.4.3.2 Les protéines du transport de l'auxine	21
2.4.3.2.1 Aux1	21
2.4.3.2.2 Pin	22
2.4.3.3 La régulation de l'influx dans les cellules	24

2.4.3.4 La régulation des gènes PIN (régulation de l'efflux)	24
2.4.4 Modèle d'interaction entre le transport polaire de l'auxine et la signalisation en réponse à l'auxine	25
2.5 L'éthylène	26
2.5.1 Régulation des gènes de synthèse de l'éthylène	26
2.5.2 Transduction du signal de l'éthylène	27
2.5.3 L'auxine et l'éthylène	30
2.6 Synthèse et objectifs de recherche	31
2.6.1 Synthèse	31
2.6.2 Hypothèses	31
2.6.3 Objectifs	32
3. MATÉRIELS ET MÉTHODE	33
3.1 Aspects physiologiques	33
3.1.1 Matériel végétal et conditions de croissance	33
3.1.2 Relevé des mesures	35
3.2 Biologie moléculaire	37
3.2.1 Extraction d'ARN chez le blé	37
3.2.2 Transcription inverse et quantité d'ADNc théorique	37
3.2.3 PCR en temps réel	38
3.2.3.1 Principe et modèle analytique	38
3.2.3.2 Protocole pour la transcription inverse et les courbes de dilutions	42
3.3 Analyse statistiques et bioinformatique	43
3.3.1 Test ANOVA	43
3.3.2 Bio-informatique	43
3.3.2.1 BLAST et alignement de séquence	43
3.3.2.2 Dessin des amorces	44
3.3.3 Puce à ADN et analyse des données	46
4. RÉSULTATS ET DISCUSSION	47
4.1 Étude de l'expression des gènes impliqués dans la synthèse de l'éthylène	47
4.1.1 Choix d'un nouveau cultivar de blé sensible à l'Al	48
4.1.2 Validation de la réponse moléculaire d'un gène de stress à l'Al pour le	49

PCR en temps réel	
4.1.3 Profil d'expression des gènes impliqués dans la synthèse de l'éthylène	61
4.2 Expression des gènes impliqués dans le métabolisme de l'auxine et l'éthylène à l'aide d'une puce à ADN	83
4.2.1 Réponses moléculaires associées à l'auxine	84
4.2.2 Réponses moléculaires associées à l'éthylène	96
4.3 Évaluation de la toxicité de J'AI sur des racines de plantes mutantes <i>d'Arabidopsis</i>	102
5. CONCLUSION ET PERSPECTIVES	106
6. RÉFÉRENCES	109

LISTE DES FIGURES

Figure		Page
2.1	La zone de transition distale est la cible principale de l'aluminium.	4
2.2	Vue simplifiée du signal de transduction lié à la voie des Ca^{2+} /phosphoinositides.	7
2.3	Modèle de l'action des protéines Aux/IAA.	16
2.4	Modèle de l'expression et de la fonction des gènes précoces régulés par l'auxine.	17
2.5	Schéma du transport polaire de l'auxine dans les racines.	20
2.6	Modèle des expériences qui ont examiné les mécanismes de contrôle de la localisation des protéines PIN 1	23
2.7	Modèle pour la voie de transduction du signal de l'éthylène et la régulation de l'expression des gènes	28
3.1	Modèle de photo modifiée pour la mesure des racines <i>d'Arabidopsis</i> .	36
3.2	Modèle explicatif de la fluorescence du SYBR GREEN utilisée pour la PCR en temps réel	38
3.3	Courbe d'amplification typique de PCR.	39
3.4	Courbe de dilution et sa droite dérivée pour une série de dilutions par 2.	41
4.1	Alignement des séquences d'acides nucléiques de OXO et d'autres séquences d'acides nucléiques homologues pour le des'sin d'amorces destinées au qRT-PCR.	51
4.2	Droite d'efficacité des amorces des gènes 18S, OXO, ACS et ACO, utilisées en qRT-PCR.	58
4.3	Courbes de dissociations pour les amorces 18S, OXO, ACS et ACO.	59
4.4	Niveau d'expression du gène contrôle de l'oxalate oxydase en	60

	fonction de la concentration d'aluminium pour les cultivars Atlas66 et Bounty.	
4.5	Alignement des séquences d'acides nucléiques de TaACS2 et d'autres séquences d'acides nucléiques homologues pour le dessin d'amorces destinées au qRT-PCR.	63
4.6	Alignement des séquences protéique de AtACO 1, OsACO et d'autres séquences protéiques pour la recherche de séquences ACO chez le blé.	71
4.7	Alignement des séquences d'acides nucléiques de OsACO et d'autres séquences d'acides nucléiques homologues pour le dessin d'amorces destinées au qRT-PCR.	73
4.8	Niveau d'expression relatif pour ACS en fonction de la concentration d'Al pour les cultivars Atlas66 et Bounty pour 6 h et 24h d'exposition.	79
4.9	Niveau d'expression relatif de ACO en fonction de la concentration d'Al pour les cultivars Atlas66 et Bounty pour 6 h et 24h d'exposition.	81
4.10	Profil d'expression relatif des gènes ABC et SAMd par qRT-PCR en fonction de la concentration d'Al pour les cultivars Atlas66 et Bounty exposés à J'Al pendant 24h.	94
4.11	Profil d'expression relatif des deux EFE dioxygénases, GEN1 et GEN2, par qRT-PCR en fonction de la concentration d'Al pour les cultivars Atlas66 et Bounty exposé à l'Al pendant 24h.	101
4.12	Courbes d'inhibition de croissance des mutants <i>d'Arabidopsis</i> exposés à différentes concentrations d'Al.	104

LISTE DES TABLEAUX.

Tableau		Page
2.1	Liste de gènes induits par l'aluminium	10
3.1	Description des mutants <i>d'Arabidopsis</i> utilisés.	34
3.2	Composition du milieu réactionnel utilisé pour le qRT-PCR.	42
3.3	Liste des amorces utilisées avec leurs séquences et le nom des gènes ciblés pour le qRT-PCR	45
4.1	Inhibition de croissance de nouveaux cultivars de plantes.	49
4.2	Mesure de l'efficacité des amorces pour le qRT-PCR.	59
4.3	Inventaire de séquences homologues aux gènes impliqués dans le transport de l'auxine.	87
4.4	Inventaire des séquences homologues aux gènes impliqués dans la signalisation en réponse à l'auxine.	88
4.5	Inventaire des séquences homologues aux gènes principaux induits par l'auxine.	89
4.6	Inventaire des gènes et niveaux d'expression provenant des résultats de la puce à ADN	90
4.7	Inventaire des séquences homologues aux gènes secondaires induits en réponse à l'auxine.	91
4.8	Séquences sélectionnées pour confirmation par qRT-PCR.	92
4.9	Inventaire des séquences homologues aux gènes impliqués dans la synthèse de l'éthylène.'	98
4.10	Inventaire des séquences homologues aux gènes impliqués dans la signalisation de l'éthylène	99
4.11	Inhibition de croissance des racines <i>d'Arabidopsis</i> en fonction de la concentration d'aluminium.	105

LISTES DES ABRÉVIATIONS ET ACRONYMES

AAO	Acide ascorbique oxydase
ACC	Acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique
ACO	ACCoxydase
ACS	ACC synthase
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ARE	Auxin response element
ARF	Auxin response factor
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATP	Adénosine tri-phosphate
aux.Res	Auxin response
AXR	Auxin resistant
BCB	Blue copper binding protein
BFA	Brefeldin A
BPI	Bowman-Birk protease inhibitor
cAMP,	Adénosine monophosphate cyclique
cGMP,	Guanosine monophosphate cyclique
CHPAA	Cyclohexylphenylacetic acid
CT	Cycle Threshold
DAG	Diacylglycérol
DNase	Désoxyribonucléase
dNTP	Désoxyribonucléoside triphosphate (dont dATP, dCTP, dGTP et TTP)
DTZ	Zone distale de transition
ER	Ethylene response
ERF	Ethylene response factor
ETR	ER-associated receptors
EREBP	Ethylen response element binding protein
EZ	Zone d'élongation
GDI	GDP dissociation inhibitor
GDP	Guanosine 5'-diphosphate
GST	Gluthatione S-transférase
HLS	HOOKLESS1
HSP150	Heat shock protein
IAA	Acide indole 3-acétique

ICR	Inhibition de la croissance racinaire
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MZ	Zone méristématique
N-1-AA	Acide 1-naphthylacétique
NPA	Acide 1-N-naphthylphthalamique
PCR	Polymerase chain reaction
PIP2	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PKC	Protéine kinase C
PLC	Phospholipase C
POX	Peroxydase
PS	Phosphatidylsérine
PSS	Phosphatidylsérine synthase
qRT-PCR	Quantitative real time PCR
RNase	Ribonucléase
SAM	S-adénosylméthionine
SAUR	Small auxin response
TIBA	Acide 2,3,5-triiodobenzoïque
TZ	Zone de transition
1-NOA	Acide 1-naphthoxyacétique
2,4-D	Acide 2,4-dichlorophenoxyacétique

LISTE DES SYMBOLES

Al	Aluminium
Al ³⁺	Ion aluminium
Ca	Calcium
Ca(NO ₃) ₂	Nitrate de Calcium
Ca ²⁺	Ion calcium
CaCl ₂	Dichlorure de calcium
CaSO ₄	Sulfate de calcium
CO ₂	Dioxyde de carbone
CuSO ₄	Sulfate de cuivre
°C	Degré Celsius
g	Gramme
h	Heure
H ⁺	Proton hydrogène
H ₃ BO ₃	Acide borique
HCl	Acide chloridrique
K	Potassium
K ⁺	Ion potassium
K ₂ SO ₄	Sulfate de potassium
kb	Kilobase
KH ₂ PO ₄	Phosphate monopotassique
KNO ₃	Nitrate de potassium
Mg	Magnésium
mg	Milligramme
µg	Microgramme
Mg ²⁺	Ion magnésium
MgSO ₄	Sulfate de magnésium
min	Minute
ml	Millilitre
mm	Millimètre
mM	Millimolaire
µM	Micromolaire
Mn ²⁺	Ion manganèse

MnSO_4	Sulfate de manganèse
mol	Mole
NaMoO_4	Molybdate de sodium
ng	Nanogramme
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Sulfate d'ammonium
P	Phosphate
pb	Paires de bases
pH	Potentiel hydrogène
%	Pourcentage
s	Seconde
U	Unité
ZnSO_4	Sulfate de zinc

RÉSUMÉ

La toxicité de l'aluminium (Al) chez les végétaux affecte principalement la croissance des racines dans la zone de transition et la zone d'élongation. Il a été démontré que l'Al bloque le transport de l'auxine, une hormone importante dans la croissance. L'accumulation de l'auxine dans certaines zones et la carence dans d'autres zones suite au blocage de son transport pourrait être responsable de l'arrêt de croissance observé. De plus, des résultats antérieurs ont montré qu'une concentration d'Al réduisant la croissance de 50% provoque la mort cellulaire de l'épiderme racinaire après 8 heures d'exposition chez les plantes tolérantes mais entraîne cet effet chez les plantes sensibles uniquement lorsque la croissance est inhibée complètement. Cet effet pourrait contribuer à la détoxification de l'Al chez les plantes tolérantes.

L'auxine peut s'accumuler rapidement à l'extrémité des racines et conduire à l'induction de gènes précoces et de gènes tardifs. Nous avons examiné l'expression des gènes tardifs à l'aide d'une puce d'ADN en utilisant des échantillons d'ARN provenant des pointes de racines (derniers 5-10 mm) de blé témoin et exposés à une ICR de 50% chez un cultivar sensible et un cultivar tolérant à l'Al. La majorité des gènes associés à l'accumulation d'auxine ne sont pas régulés par l'Al suggérant que cette accumulation est localisée dans une très petite zone de la racine de telle sorte que les ARN s'accumulent localement contribueraient très peu à l'ensemble des transcrits de l'échantillon de tissus utilisé. Toutefois, quelques gènes spécifiquement induits par l'auxine (*GH3*, *ARF*) sont surexprimés après 24 heures d'exposition suggérant que l'auxine s'accumule effectivement chez le blé exposé à l'Al tout comme chez *Arabidopsis*. Deux gènes codant pour des glutathion S-transférases sont surexprimés chez la variété tolérante par rapport à la variété sensible et sont donc associés à la tolérance à l'Al. Les gènes appartenant à la famille des *GSTs* qui ont été associés à la tolérance à l'Al pourraient être régulés différenciellement entre les variétés tolérantes et sensibles. Puisque certaines *GST* sont régulés par l'auxine, il est important de poursuivre la caractérisation des promoteurs de ces *GST* ainsi que des voies de signalisation qui sont impliquées. De plus, la caractérisation de ces gènes est une piste intéressante car les *GSTs* ont souvent été associées à la détoxification du stress oxydatif, une composante importante des effets de l'Al.

L'éthylène est impliquée dans la mort cellulaire pour différents stress biotiques et abiotiques. Une augmentation de production de cette hormone est parfois liée à une augmentation d'auxine ou peut être activée indépendamment. Toutefois, cette production est généralement liée à une augmentation de transcription des gènes principaux impliqués dans sa synthèse, soit les gènes ACC synthase (*Acs*) et ACC oxydase (*Aco*). Nous n'avons observé aucun changement dans l'expression de ces transcrits chez la variété de blé tolérante à l'Al (Atlas66) après 6 heures (avant la mort cellulaire) ou 24 heures d'exposition à l'Al. Par contre une augmentation transitoire d'un facteur 3 a été observé pour le transcrit *Aco* à forte concentration d'Al chez la variété sensible à l'Al (Bounty). Une analyse par puce d'ADN nous a permis d'identifier deux « ethylene forming enzyme » dioxygénases dont l'expression augmente entre 2 et 3 fois chez les deux type de cultivars à un ICR de 50%. Ces enzymes pourraient être associés à une augmentation de la synthèse d'éthylène. Un transcrit codant pour une *EREBP* (ethylene responsive element binding protein) est exprimé plus fortement

(2.6 X) chez la variété sensible mais son expression ne varie pas chez la variété tolérante. Une protéine de cette classe a été impliquée comme répresseur de la mort cellulaire et de l'élongation cellulaire. La surexpression d'un tel facteur pourrait expliquer l'absence de mort cellulaire observée à une ICR de 50% chez le blé sensible et supporter l'hypothèse du rôle de la mort cellulaire dans la détoxification de l'Al chez le cultivar tolérant.

Afin de déterminer si l'Al cause l'arrêt de croissance racinaire via une accumulation d'auxine ou d'éthylène, nous avons utilisé le modèle *d'Arabidopsis* car différents mutants insensibles à l'auxine et/ou à l'éthylène sont disponibles. Nos résultats ont montré que toutes les lignées demeurent très sensibles à l'Al démontrant que l'arrêt de croissance causé par l'Al n'est pas directement lié à l'accumulation d'une de ces hormones. En conséquence, l'accumulation d'auxine observée pourrait être causée par l'inhibition de croissance plutôt que d'en être la cause. Toutefois, il demeure possible qu'une carence localisée en auxine puisse être responsable de l'inhibition de croissance. Les analogues d'auxine liposolubles qui ne sont pas soumis à une régulation par les transporteurs membranaires pourraient permettre de compenser les carences d'auxine présentes dans les zones sensibles. Ces analogues d'auxine pourraient être utilisés afin de vérifier cette possibilité.

Mots clé : Blé, *Arabidopsis*, aluminium, auxine, éthylène, toxicité, inhibition racinaire, mort cellulaire.

1. INTRODUCTION GÉNÉRALE

La toxicité de l'aluminium (Al) intervient comme le principal facteur limitant la productivité agricole sur les terres acides (Foy *et al.*, 1978). La surface des sols acides représente près de 70 % des terres cultivables et ne fait que s'accroître en raison des pluies acides et de la pollution. Le développement de la tolérance au métal est une manière pour les plantes de réduire les effets nocifs d'une exposition excessive aux ions métalliques. Les espèces et les variétés de plantes ont une tolérance qui varie face à l'excès d'Al dans leur milieu de croissance (Foy *et al.*, 1978). Malgré son importance agronomique et son intérêt économique, les mécanismes fondamentaux régissant la tolérance et la toxicité de l'Al chez les plantes ne sont pas encore bien définis.

Le premier et principal impact de la toxicité de l'Al est l'inhibition de croissance racinaire (Taylor, 1988). Plusieurs études ont identifié la partie distale de la zone de transition (DTZ) dans les pointes de racines comme la cible initiale du métal (Hasenstein et Evans, 1988 ; Kollmeier *et al.*, 2000 ; Sivaguru et Horst, 1998). Dans cette région des racines, l'Al peut affecter l'organisation du cytosquelette (Blancaflor *et al.*, 1998) et inhiber le transport de l'auxine (Hasenstein et Evans, 1988 ; Kollmeier *et al.*, 2000) qui est étroitement lié à l'organisation du cytosquelette (Muday et Murphy, 2002).

L'auxine est une hormone impliquée dans de nombreux phénomènes dont la croissance, le développement, le phototropisme et le gravitropisme de la plante. Au niveau cellulaire, ces phénomènes sont caractérisés par une implication dans les mécanismes de division, d'élongation et de différenciation. Il est établi qu'à faible concentration, l'auxine stimule la croissance et le développement des tiges et des racines, alors qu'à plus forte dose elle inhiberait la croissance des racines (plus sensibles que les tiges) (Went et Thiemann, 1937). Chez le blé, Hasenstein et Evans (1988) ont montré que l'Al inhibait le transport de l'auxine au niveau de la DZ et provoquait un arrêt de la croissance du côté où l'Al est appliqué. Cette inhibition du transport de l'auxine par l'Al a été confirmée chez le maïs par Kollmeier *et al.* (2000) en notant une différence entre les cultivars sensibles et tolérants. Sur

la base de ces résultats nous avons émis l'hypothèse que l'Al provoquait une accumulation d'auxine suffisante pour inhiber la croissance des racines.

D'autre part, l'éthylène est connu depuis longtemps pour être induit par l'auxine (Kang *et al.*, 1971), et son implication dans le processus de mort cellulaire (He *et al.*, 1996) a soulevé notre intérêt en association avec la toxicité de l'Al. En effet, Delisle *et al.* (2001) ont montré que la mort cellulaire apparaissait, en présence d'Al, sur les racines de blé de cultivar tolérant et pas chez le cultivar sensible pour une inhibition racinaire de 50 %. Les auteurs ont suggéré que la mort cellulaire pouvait représenter un mécanisme de détoxification de l'Al qui expliquerait en partie la différence de tolérance à l'Al entre les cultivars.

Ce mémoire présente un état des connaissances sur la toxicité et la tolérance associée à l'Al ainsi qu'une brève présentation de l'éthylène et de l'auxine, et des hypothèses qui associent leurs réponses à la toxicité de l'Al. Les travaux que j'ai effectués dans le cadre de ma maîtrise ont consisté à étudier la toxicité de l'Al sur les réponses moléculaires de l'auxine et de l'éthylène dans les pointes de racines. J'ai établi le profil d'expression des gènes de synthèse de l'éthylène dans les pointes de racines de blé par PCR en temps réel (qRT-PCR). Puis grâce aux résultats provenant d'une puce à ADN, j'ai confirmé par la technologie qRT-PCR les différences d'expression de certains gènes impliqués dans les mécanismes moléculaires de l'auxine et de l'éthylène. Enfin, après avoir mis au point une méthode d'analyse, j'ai mesuré les différences de croissances entre différentes lignées de mutants d'*Arabidopsis* résistants à l'auxine et/ou à l'éthylène afin de déterminer si la sensibilité à l'Al est associée à une accumulation trop importante de ces hormones.

2. ÉTAT DES CONNAISSANCES

2.1 Spéciation de l'aluminium

L'Al est le métal le plus abondant de la croûte terrestre. Il représente 7.5 % de la lithosphère (Haug, 1984). Dans un sol à pH neutre, il y sera retrouvé sous formes complexées non toxiques pour les plantes (aluminosilicates ($\text{Al}_2\text{O}_5\text{Si}$), oxydes d'Al (Al_2O_3) gibbsites ($\text{Al}(\text{OH})_3$), ou liées à des minéraux ou à des composés organiques insolubles. Ce n'est que dans les sols acides, ou lorsque les sols sont acidifiés (pluies acides) que l'Al prend une forme libre phytotoxique Al^{3+} .

La forme de l'Al est dépendante du pH. L'Al est ainsi représenté par ces formes qui suivent un pH croissant et une protonation graduelle jusqu'au pH 7.4 : $\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+} \rightarrow \text{Al}(\text{OH})^{2+} \rightarrow \text{Al}(\text{OH})_2^+ \rightarrow \text{Al}(\text{OH})_3 \rightarrow \text{Al}(\text{OH})_4^-$ (Kinraide, 1991 ; Delhaize et Ryan, 1995). La proportion de ces espèces est ainsi dépendante du pH. À pH 3.0, l'espèce $\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$ (Al^{3+} par convention) considérée comme la plus toxique pour les plantes, est présente à plus de 95 %. À ce pH les éléments Al^{3+} affectent grandement les racines et la croissance des plantes monocotylédones (Kochian, 1995). À des pH légèrement supérieurs (pH4.5), les formes $\text{Al}(\text{OH})^{2+}$ et $\text{Al}(\text{OH})_2^+$ en plus grande proportions, ont montré une plus grande toxicité vis-à-vis des plantes dicotylédones (Alva *et al.*, 1986 ; Kinraide et Parker, 1990).

Chez plusieurs plantes, principalement des céréales, des différences de sensibilité à l'Al ont été constatées entre des genres et même entre des variétés. Parmi ces plantes, le riz a été reconnu comme l'espèce la plus tolérante et l'orge comme la plus sensible (Aniol et Gustafson, 1984). Le blé qui constitue un modèle intermédiaire à l'orge et au riz, présente des variations importantes de sensibilité à l'Al selon les variétés étudiées (Aniol et Gustafson, 1984).

2.2 Mécanismes de toxicité de l'aluminium

2.2.1 Cibles et symptômes

Sivaguru et Horst (1998) ont mis en évidence que la cible de l'Al était localisée au niveau de la partie distale de la zone de transition (DTZ) des apex racinaires (Fig. 2.1). Cette zone est caractérisée par un changement de mode mitotique (dans la zone du méristème MZ) vers une phase préparatoire à une élévation rapide (dans la zone d'élévation EZ).

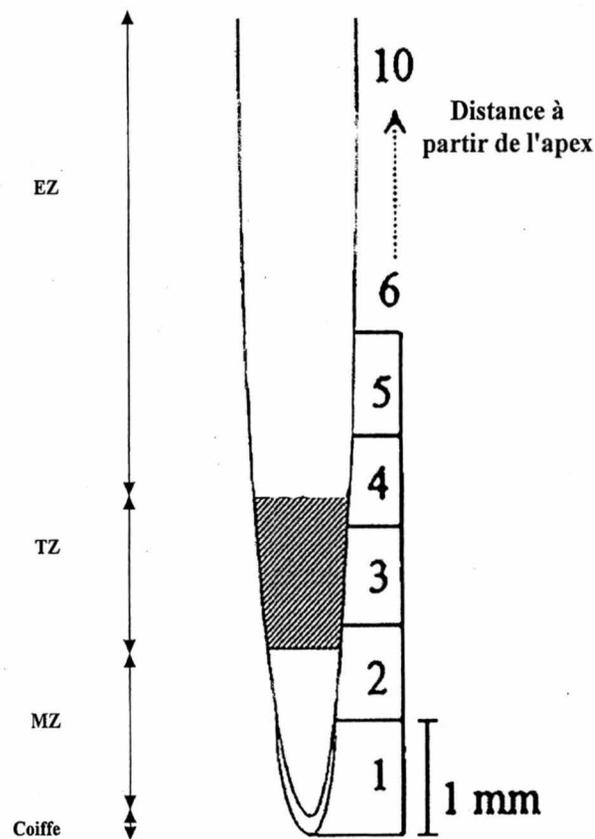


Figure 2.1 : La zone de transition distale est la cible principale de l'aluminium. Les différentes régions de l'apex racinaire de maïs (*Zea mays* L. cv Lixis). EZ : zone d'élévation, MZ : zone méristématique et TZ : zone de transition. La DTZ, partie la plus distale (éloignée) de la TZ par rapport à l'extrémité racinaire, est la cible principale de l'Al (Sivaguru et Horst, 1998).

Le premier effet physiologique observable de la toxicité de l'Al à pH acide est l'inhibition de croissance racinaire (Taylor, 1988). Ce mécanisme intervient dès la première heure d'exposition (Kochian, 1995). À plus long terme (1 à 2 jours), les racines brunissent, accumulent de la callose et deviennent cassantes. La croissance des racines secondaires, dont la formation a été induite par l'Al, est réprimée après leur initiation. La toxicité se révèle donc surtout au niveau du système racinaire puisqu'il provoque une atrophie de ce dernier. Ces différents effets sont modulés par la sensibilité de la plante au métal. Il existe en fait plusieurs variétés de blé possédant des sensibilités différentes à l'Al (Carver et Owny, 1995).

2.2.2 Signalisation et transport membranaire

Plusieurs mécanismes de toxicité opérant dans l'apoplasme (extérieur de la cellule) (Rengel et Eliot, 1992) et le symplasme (intérieur de la cellule) des cellules ont été proposés (Jones et Kochian, 1995 ; Kochian, 1995 ; Jones *et al.*, 1998a, b). Cependant, même s'il a été récemment démontré que l'Al s'accumulait dans les noyaux (Silva *et al.*, 2000), le métal interagirait d'abord avec la membrane plasmique, modifiant ainsi une partie de son intégrité fonctionnelle (Kinraide *et al.*, 1992).

La toxicité de l'Al provoque rapidement une réduction de l'entrée de K^+ , Ca^{2+} , NH_4^+ et plusieurs autres cations (Foy *et al.*, 1978 ; Kinraide et Parker, 1987). L'élongation cellulaire peut être corrélée avec l'entrée de cations, plus spécifiquement de K^+ par les canaux voltage-dépendants, qui maintient le volume des cellules par équilibre osmotique (Frensch, 1997). Liu et Luan (2001) ont montré que ces canaux sont bloqués par l'Al au niveau intracellulaire de la membrane plasmique.

En plus de ces variations osmotiques, les variations de flux ioniques ont pour conséquence de modifier le potentiel membranaire. Un autre aspect important de la toxicité de l'Al serait donc l'altération du potentiel membranaire qui peut être un frein au transport de différents ions dans les cellules de racines (Kinraide, 1994; Kinraide, 1998). Cet effet est également associé à une diminution du pH intracellulaire (Lindberg et Strid, 1997).

Récemment, dans les racines de courge, il a été montré que l'Al peut inhiber l'activité H⁺-ATPase par la déstabilisation des membranes plasmiques (Ahn *et al.*, 2001). Cette activité pourrait également entraver le transport passif de l'auxine sous sa forme protonée (voir section 2.4.3.1, Transport polaire et non-polaire).

L'effet de l'Al sur le métabolisme du calcium a reçu ces dernières années une attention toute particulière car le calcium est au centre de nombreux processus cellulaires tels que la division et le gravitropisme (Helper et Wayne, 1985). L'inhibition par l'Al de l'influx du Ca²⁺ est rapide et réversible dans les plantes. Ce phénomène précède l'apparition des symptômes visibles de la toxicité du métal (Huang *et al.*, 1992 ; Huang *et al.*, 1996 ; Ryan et Kochian, 1993). Cependant, l'Al peut inhiber sévèrement la croissance sans réduire le transport du Ca²⁺ (Ryan et Kochian, 1993). En plus de cela, Huang *et al.* (1996) ont montré sur des vésicules membranaires purifiées, que l'Al bloquait de la même manière les canaux calciques chez les variétés sensibles et tolérantes de blé. Les variations de concentrations du calcium intracellulaire ne présentent donc pas de corrélation avec les mécanismes de tolérance à l'Al.

L'intervention de l'Al au niveau de l'homéostasie du Ca²⁺ peut se faire directement par les récepteurs voltage-dépendant ou par un dérèglement du potentiel membranaire. L'Al inhibe également l'activité de la phospholipase C, une enzyme impliquée dans la voie de signalisation des phosphoinositides (Kochian, 1995). Cependant, cette voie de signalisation contrôle la sortie de Ca²⁺ depuis le réticulum endoplasmique où l'inositol 1,4,5-triphosphate induit un relargage de calcium dans le cytoplasme (Fig. 2.2) (Haug *et al.*, 1994).

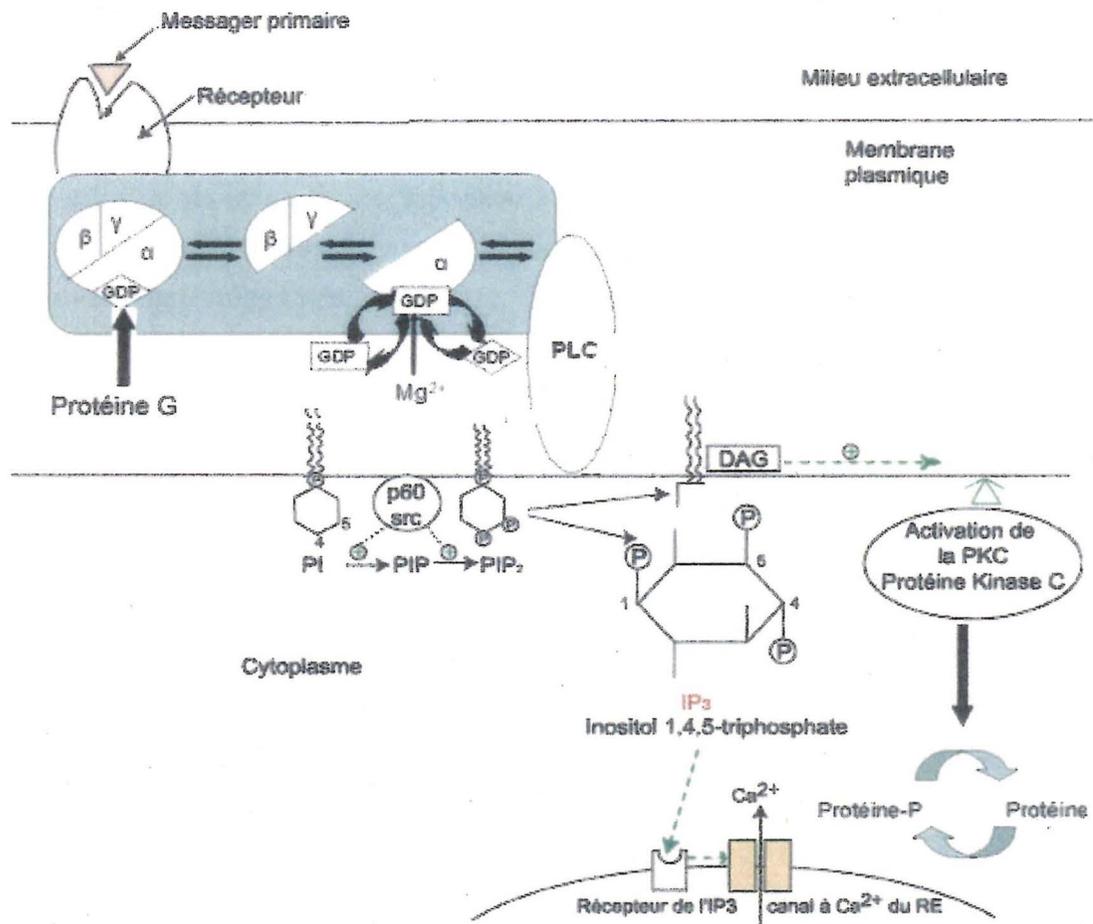


Figure 2.2 : Vue simplifiée du signal de transduction lié à la voie des Ca^{2+} /phosphoinositides.

Une zone bleutée désigne les éléments de transduction du signal comme étant probablement ciblés par les ions Al. Le signal d'entrée responsable de la croissance (possiblement l'auxine, voir 2.4.2.2. Transduction du signal en réponse à l'auxine) s'effectue par fixation d'un messenger primaire sur un récepteur à la surface de la membrane plasmique, provoquant ainsi la transmission du signal à une protéine G_p hétérotrimérique. La sous-unité G_α se détache des sous-unités $G_{\beta\gamma}$ en échangeant le GDP pour du GTP. La sous-unité G_α active une phosphoinositide (PIP_2) spécifique de la phospholipase C (PLC), produisant ainsi deux seconds messagers à savoir IP_3 et le diacylglycerol (DAG). La phase off de la transmission du signal est initiée par l'hydrolyse du GTP qui permet la réassociation des sous-unités G_p . Par une série de réactions telles que des déphosphorylations menant à IP_2 et IP , IP_3 et le DAG sont métabolisés et PIP_2 est synthétisé via PI et PIP. PKC, *protéine kinase C* ; *protein-P*, *protéine phosphorylée*.

En examinant cette figure on remarque que l'Al pourrait affecter d'autres étapes de la voie de signalisation par exemple en compétitionnant avec le Mg^{2+} nécessaire à la protéine GTPase ou en affectant la protéine kinase C. Des résultats préliminaires ont montré que la calphostine C, un inhibiteur de protéine kinase C, bloque la croissance cellulaire et induit les mêmes gènes de stress qu'une exposition à l'Al (Gladu, 1999). Ces résultats suggèrent qu'une voie de régulation impliquant le blocage direct ou indirect de la protéine kinase C est associée à l'exposition à l'Al.

2.2.3 Cytosquelette

De nombreux désordres neurologiques, induits par l'Al, ont déjà été associés à des anomalies des composants du cytosquelette (Schmidt *et al.*, 1991; Singer *et al.*, 1997). Un modèle proposé pour les anomalies survenant au niveau du cytosquelette impliquerait la liaison du GTP. L'Al fixe 10^7 fois mieux les sites de liaisons du GTP que le Mg^{2+} qui y est nécessaire pour l'assemblage des microtubules. Lorsque l'Al est lié au complexe GTP-tubuline, l'échange de GTP pour le GDP est plus lent. C'est ainsi que la perturbation du système microtubulaire pourrait s'effectuer (McDonald *et al.*, 1987; McDonald et Martin, 1988). En complément, une étude sur la perturbation des neurofibrilles chez les mammifères induite par l'Al a révélé que l'Al affectait aussi l'expression des régulateurs du cytosquelette, la phosphorylation des protéines du cytosquelette et la production de messagers secondaires (cAMP, cGMP, inositol 1,4,5-triphosphate) intervenant dans la régulation dynamique du cytosquelette (Strong *et al.*, 1997). Des changements de morphologie, induits par l'Al pendant la croissance des racines et des tiges, sont associés à la perte de l'élongation cellulaire et un gonflement des tissus (McDonald et Martin, 1988; Ryan *et al.*, 1993; Sasaki *et al.*, 1996). Ces symptômes ont conduit à l'hypothèse suivant laquelle le cytosquelette serait une cible cellulaire de la toxicité de l'Al (Blancaflor *et al.*, 1998). Le contrôle de l'organisation du cytosquelette chez les plantes a permis d'impliquer le système de signalisation des phosphoinositides, de même que le rapport Ca^{2+} /Calmoduline, tous deux cibles potentielles de l'Al (Haug *et al.*, 1994). Plus récemment, Blancaflor *et al.* (1998) ont observé qu'une stabilisation et une réorientation des microtubules survenaient après une heure d'exposition à

une dose inhibitrice d'Al dans la région de la DTZ. Cette modification du réarrangement cytosquelettique pourrait être la cause de l'inhibition du transport basipétal de l'auxine causé par l'Al (Hasenstein et Evans, 1988; Kollmeier *et al.*, 2000) par la délocalisation des protéines transportant l'hormone (voir Fig. 2.6 et section 2.4.2.2. Pin).

Il ressort de ces études que la DTZ est bien la cible initiale de l'Al. Certaines découvertes pertinentes, qui ont développé très peu d'intérêt, ont validé les précédents travaux tout en montrant que l'inhibition du transport d'auxine était plus marquée chez les variétés sensibles de maïs que chez les variétés tolérantes. Ces résultats mettent ainsi de l'avant des mécanismes impliquant le métabolisme de l'auxine dans la problématique de la toxicité de l'Al.

2.3 Tolérance à l'Aluminium

2.3.1 Aspects génétiques et moléculaires

Chez le blé, la tolérance serait un caractère héréditaire, dominant et multigénique lié à 1 à 3 gène(s) (ou locus (loci)) majeur(s), et plusieurs autres gènes mineurs. Les différents gènes impliqués seraient localisés sur le bras court du chromosome 5A, 6A et sur les longs bras des chromosomes 2D, 3D et 4D (Aniol, 1995 ; Berzonsky, 1992 ; De Oliviera, 1981 ; De Oliviera, 2000). Chez l'orge, ce phénotype ne serait rattaché qu'à 2 loci majeurs situés sur les chromosomes 4R et 6R (Gallego *et al.*, 1998). Chez le riz, 3 loci majeurs impliqués dans la tolérance ont été localisés sur les chromosomes 3R, 4R et sur le bras court du 6R (Nguyen *et al.*, 2002). Enfin chez *Arabidopsis* des analyses QTL (*Quantitative Trait Locus*) ont permis d'identifier 2 loci majeurs apportant la tolérance à l'Al, expliquant les variations entre les espèces tolérantes (Columbia) et sensibles (*Landsberg erecta*) (Kobayashi et Koyama, 2002 ; Hoekenga *et al.*, 2003).

Tableau 2.1 : Liste de gènes induits par l'aluminium. Liste de gènes induits par l'Al classés selon leur fonction cellulaires.

Catégorie de protéine	Protéine potentielle	Gène	Références
Synthèse de lignine	phénylalanine ammonia-lyase	<i>wali4</i>	Snowden et Gardner (1993)
	"	<i>war7.2</i>	Hamel <i>et al.</i> (1998)
	Putative cinnamyl-alcohol dehydrogenase	<i>OsAR6</i>	Mao <i>et al.</i> (2004)
	p-coumarate 3-hydroxylase	<i>OsAR7</i>	Mao <i>et al.</i> (2004)
Paroi cellulaire	Xylose isomérase	<i>OsAR9</i>	Mao <i>et al.</i> (2004)
	Beta-1,3-glucanase	<i>OsAR10</i>	Mao <i>et al.</i> (2004)
	UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase	<i>OsAR11</i>	Mao <i>et al.</i> (2004)
Stress oxydatif	Quinone oxidoreductase	<i>OsAR13</i>	Mao <i>et al.</i> (2004)
	Oxalate oxydase	<i>War13.2</i>	Hamel <i>et al.</i> (1998)
	Glutathione S-transférase	<i>GST</i>	Ezaki <i>et al.</i> (1995)
Métabolisme	Proteinase inhibitor	<i>wali5</i>	Snowden et Gardner (1993)
	"	<i>AtBPI</i>	Richards <i>et al.</i> (1998)
	Facteur d'élongation EF-2	<i>OsAR15</i>	Mao <i>et al.</i> (2004)
	SUMO-1	<i>OsAR16</i>	Mao <i>et al.</i> (2004)
Autres	Rice KN1-like protein	<i>OsAR18</i>	Mao <i>et al.</i> (2004)
	protéine <i>multi drug resistant</i>	<i>Ta MDR1</i>	Sasaki <i>et al.</i> (2002)
	Protéine récepteur kinase associée à la paroi cellulaire	<i>Wak1</i>	Sivaguru <i>et al.</i> (2003)
	peroxydases	<i>NtPOX</i> , <i>war4.2</i>	Ezaki <i>et al.</i> (1996) Hamel <i>et al.</i> (1998)
	une protéine heat-shock	<i>HSP150</i>	Ezaki <i>et al.</i> (1998)
	protéine <i>blue copper binding</i>	<i>AtBCB</i>	Richards <i>et al.</i> (1998)
	inhibiteur de dissociation du GDP	<i>NtGDII</i>	Ezaki <i>et al.</i> (1997)
metallothioneine-like protein	<i>Wali1</i>	Snowden et Gardner (1993)	

L'Al induit l'expression de plusieurs gènes impliqués dans les stress biotiques (pathogènes) et abiotiques (froid, métaux) et pouvant être reliés à des fonctions dans le métabolisme cellulaire (Tableau 2.1). Cependant tous ces gènes sont associés à la toxicité et non à la tolérance à l'Al puisque leur expression est augmentée de manière similaire chez les plantes sensibles et tolérantes et mènent à de faibles améliorations de la tolérance à l'Al lorsque surexprimés chez *Arabidopsis* (Ezaki *et al.*, 2000).

2.3.2 Expression de la tolérance

Actuellement deux mécanismes généraux sont proposés pour expliquer la tolérance à l'Al chez les plantes. Tout d'abord, la tolérance interne à l'Al permet de chélater ou de sous-compartimenter l'Al dans les vacuoles. Cependant, ce mécanisme, qui fonctionne chez certaines espèces, est peu probable chez le blé car les cultivars tolérants accumulent moins d'Al (Taylor, 1995). Le deuxième mécanisme très approfondi et débattu aux cours des dernières années réside dans l'exclusion de l'Al ou la chélation de l'Al hors du symplasme par la sécrétion d'acides organiques (Ma, 2000).

Une bonne corrélation a pu être établie entre la sécrétion d'acides organiques en réponse à l'Al et la tolérance de plusieurs variétés de plantes (Delhaize *et al.*, 1993; Ryan *et al.*, 1995; Pellet *et al.*, 1995; Ma *et al.*, 1997a, b; Ma et Miyasaka, 1998; Larsen *et al.*, 1998). Sasaki *et al.* (2004), ont identifié le gène ALMT1 codant pour un transporteur de malate. Ce gène est exprimé de manière constitutive dans les apex de racines de blé à un niveau beaucoup plus élevé chez les cultivars tolérants que chez les cultivars sensibles. La surexpression de ce gène dans l'orge a permis d'améliorer la tolérance de manière significative (10 fois) (Delhaize *et al.*, 2004).

Cependant, d'autres études ont démontré l'absence de corrélation entre la différence de sécrétion d'acides organiques et la tolérance chez le riz. Il a également été démontré que certains cultivars de riz sensibles au métal sécrétaient plus d'acides organiques que les cultivars tolérants (Ishikawa *et al.*, 2000).

De la même manière les stratégies impliquant la sur-expression d'acides organiques dans les plantes transgéniques est mitigée. Une stratégie impliquant une sur-expression d'acides organiques (10 fois plus que dans le témoin sauvage) a ainsi permis une excretion 4 fois plus importante de citrate (De la Fuente *et al.*, 1997) et a permis d'améliorer la tolérance à l'Al d'un facteur deux chez une variété sensible de papaye et de tabac. Par contre l'utilisation d'une souche de tabac transgénique exprimant 100 fois plus de citrate que le témoin n'a pas montré une augmentation de la tolérance comparable aux précédents résultats, ni une accumulation de citrate dans les racines (Delhaize *et al.*, 2001). On peut donc statuer qu'il existe d'autres mécanismes de tolérance plus efficaces que la sécrétion d'acides organiques et que cette dernière ne joue qu'un rôle mineur dans la tolérance à l'Al.

En conclusion sur les mécanismes de tolérance, on peut dire qu'aucun des gènes induits par l'Al identifiés à ce jour n'a été associé à la tolérance (induction plus forte chez le cultivar tolérant). Seule la surexpression du gène AMLT1 chez l'orge a permis d'améliorer de façon importante la tolérance à l'Al tel qu'observé chez les variétés tolérantes.

2.3.3 Activités redox dans les pointes de racines.

L'Al induit l'expression de plusieurs gènes qui possèdent une forte homologie avec des gènes induits par les pathogènes, les blessures et le stress oxydatif. La réponse des plantules à ces différents stress se caractérise de manière rapide (moins de 4 heures après le contact avec le stress) par la formation d'espèces d'oxygènes réactives, représentées en majorité par le peroxyde H_2O_2 ou par les radicaux libres O_2^- (Hammond-Kosack et Jones, 1996). Cette activité redox dans les racines a été directement liée à l'inhibition de croissance et au gravitropisme (Joo *et al.*, 2001)

Une activité redox associée avec la croissance des racines (transfert d'électrons détecté avec le *nitro blue tetrazolium*, NBT) et très sensible à l'Al, a été identifiée par Maltais et Houde (2002). Cette activité est inhibée en quelques minutes chez les cultivars sensibles et tolérants mais on constate un retour de cette activité chez le cultivar tolérant après 24 h. Ceci

démontre la présence d'un mécanisme inductible qui permet le rétablissement de la croissance chez les cultivars tolérants (Maltais et Houde, 2002).

D'autre part l'auxine stimule l'activité H⁺-ATPase membranaire nécessaire à la stabilité membranaire et à la croissance (revue dans Hager, 2003). La toxicité de l'Al a montré une action inhibitrice sur cette activité enzymatique (Ahn *et al.*, 2001). De plus, un cytb 561 ayant la capacité de transférer des protons et des électrons a été récemment identifié sur la membrane plasmique dans les racines d'*Arabidopsis* (Verelst *et al.*, 2004). Bien que l'activité redox de cette protéine n'a pas encore été reliée directement à l'auxine, les propriétés de ce cytochrome suggèrent que c'est un candidat intéressant associant une pompe à protons et une activité redox durant la croissance.

Malgré les liens établis entre l'accumulation d'auxine et l'inhibition de croissance dans les racines causée par l'Al, les mécanismes d'action sont encore obscurs. Cependant, ces excès ou carences en auxine pourraient être responsable de l'arrêt de croissance selon les types cellulaires impliqués (excès à certains endroits et carences dans d'autres cellules). Il a été démontré qu'un excès d'auxine induit les mêmes gènes de stress qu'une exposition à l'Al et bloque l'activité redox associée à la croissance des racines (Gladu, 1999). L'auxine pourrait être un acteur majeur associé à toxicité de l'Al et il est important de développer une revue des connaissances pouvant l'impliquer dans cette problématique.

2.4 L'auxine

2.4.1 Le métabolisme de l'auxine dans les racines

Il est connu depuis longtemps que l'auxine est véhiculée des tiges jusqu'aux racines via un système de transport polaire. Cependant une attention plus particulière a été accordée aux mécanismes d'accumulation de l'auxine dans les pointes racinaires. Comme les racines sont plus sensibles que les tiges à l'auxine (Went et Thiemann, 1937), il paraît peu vraisemblable de penser que l'auxine à forte concentration puisse être tolérée dans la croissance des pointes

de racines. Kerk *et al.* (2000) ont montré l'existence d'un système régulateur de la concentration d'auxine dans les apex racinaires de maïs. En effet, la synthèse d'ascorbate oxydase (AAO), dont l'expression est induite par l'auxine, permet le maintien de cellules en phase stationnaire G1 dans l'apex racinaire, formant ainsi le centre de quiescence. Le maintien du centre de quiescence par l'AAO est indispensable dans l'organisation des apex (Kerk et Feldman, 1995). Mais l'AAO a surtout montré une capacité à inactiver l'acide indole-3-acétique (IAA), qui est la forme d'auxine la plus abondante naturellement présente chez les plantes (Kerk *et al.*, 2000). Suivant ce modèle, l'auxine à concentration inhibitrice pour la croissance des racines pourrait être dégradée par la sécrétion d'AAO dans les cellules du centre de quiescence des racines. Cette enzyme agirait en inactivant l'IAA par décarboxylation. Ce modèle va en contresens des opinions actuelles selon lesquelles l'auxine serait majoritairement inactivé par conjugaison avec des sucres *in vivo* (Ljung *et al.*, 2002). Cependant les expériences réalisées sur le métabolisme de l'IAA ont très peu ciblé les pointes racinaires et l'activité de l'AAO pourrait être importante pour limiter la quantité d'auxine et maintenir l'activité redox identifiée dans les pointes de racines et qui est affectée par la toxicité de l'Al.

2.4.2 Expression génétique en réponse à l'auxine

2.4.2.1 Expression et régulation des gènes induits en réponse à l'auxine

Le développement normal de la plante, aussi bien que son adaptation aux variations environnementales nécessite une régulation précise de l'expression génétique. Pour des réponses à ces facteurs variables, des gènes précoces et retardés ont été identifiés. Les gènes précoces sont des gènes qui répondent de manière assez rapide (5 à 15 minutes) à ces stimuli. En principe, ces gènes ne requièrent pas l'expression d'autres gènes et répondent directement à l'induction par le stimulus (Theologis, 1986). À l'opposé, les gènes retardés s'expriment relativement lentement, répondent indirectement et nécessitent l'expression d'autres gènes dans la réponse de la plante. Jusqu'à présent, plusieurs gènes et familles de gènes, démontrant des variations d'expression en réponse à l'auxine, ont été identifiés.

Parmi les gènes précoces, on retrouve les *AUX/IAA* qui sont considérés comme les régulateurs de base de l'expression génétique en réponse à l'auxine. Le modèle le plus courant les voit comme des répresseurs agissant sous forme de dimères en encombrant par fixation les éléments de réponse à l'auxine (auxRes) présents dans les promoteurs. Une réponse induite par l'auxine va, dans ce modèle, dégrader les protéines *AUX/IAA* et permettre la fixation des facteurs de transcription en réponse à l'auxine (ARF) (Fig. 2.3) (Leyser, 2002 ; Liscum et Reed 2002). Cette régulation par dé-répression va permettre l'induction d'autres gènes précoces tels que les *small auxin RNA (SAUR)* de même que les *GH3*, dont les fonctions sont actuellement obscures (Leyser, 2002).

Comme mentionné précédemment, l'expression de gènes retardés intervenant dans différents processus biologiques n'est pas toujours corrélée de manière directe à la réponse finale de la plante. Dans la plupart des études d'expression concernant les gènes précoces on constate que les concentrations d'auxines exogènes utilisées sont inhibitrice pour la croissance de la racine (Abel et Theologis, 1996 ; Mizuno *et al.*, 2002 ; Overvoorde *et al.*, 2005 ; Takahashi et Nagata, 1992 ; Ulmasov *et al.*, 1999). Cependant, un exemple bien caractérisé implique la glutathione S-transférase (GST). Cette enzyme, qui catalyse la réduction du glutation en éléments électrophiles (Salinas et Wong, 1999), est associée à la détoxification et à la protection contre les agressions oxydatives (Timmerman, 1989). Un homologue de *GST*, *parB*, a été le premier gène identifié montrant une induction à l'auxine (Takahashi et Nagata, 1992). Le gène *parB* peut être induit par d'autres facteurs tels que l'Al ou des stress environnementaux. Ceci supporte les relations observées entre le métabolisme de l'auxine et les effets de l'Al (inclus dans *Other Inducers*) (Fig. 2.4) (Abel et Theologis, 1996).

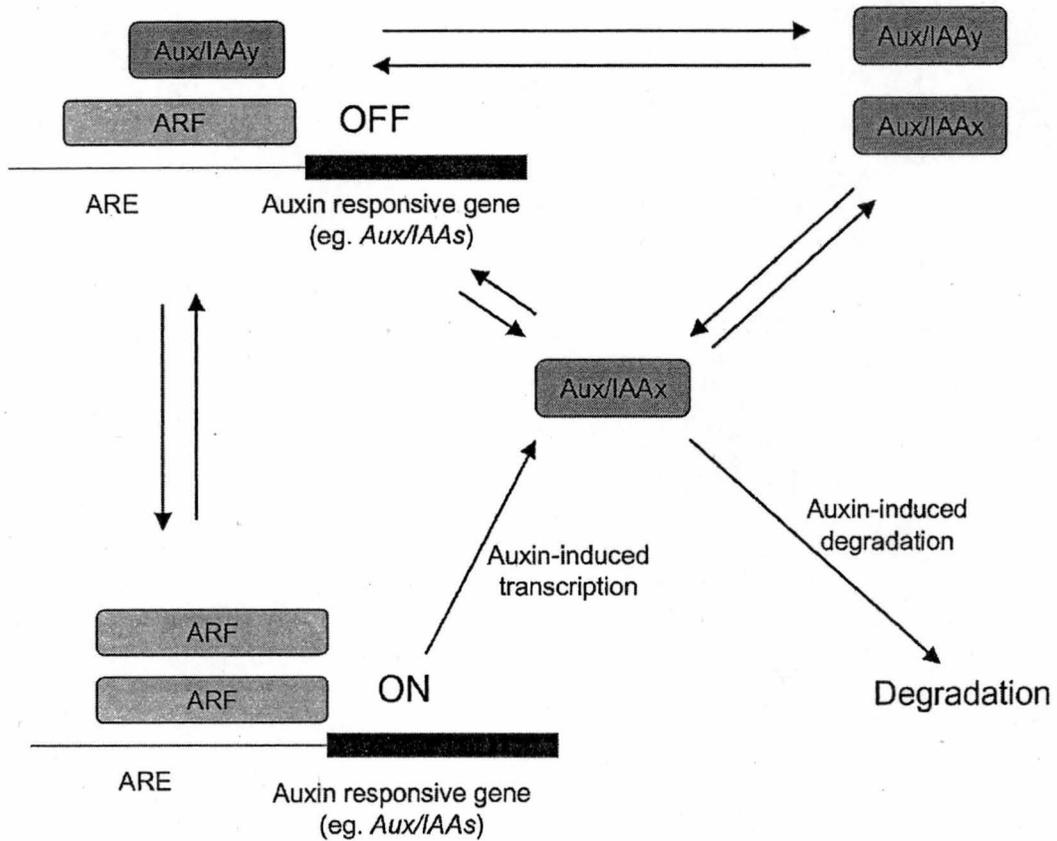


Figure 2.3: Modèle de l'action des protéines AUX/IAA.

Les protéines AUX/IAA sont capables de former des dimères avec d'autres protéines AUX/IAA, mais aussi avec les membres de la famille des ARF. L'équilibre entre ces deux types de dimères régule la transcription des promoteurs contenant les ARE. L'abondance de chacun des membres de la famille des AUX/IAA (par exemple AUX/IAAx) est régulée par la transcription et la dégradation, via l'action de l'auxine. La dynamique de ce réseau est apparemment très complexe (Leyser, 2002).

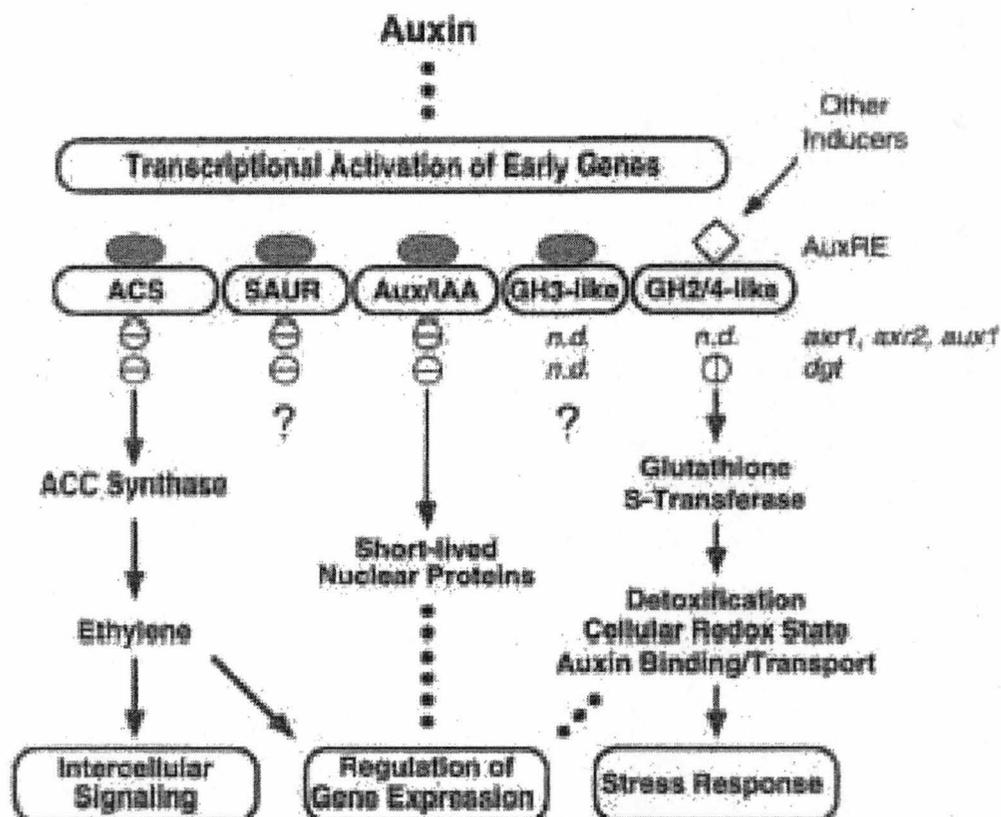


Figure 2.4 Modèle de l'expression et de la fonction des gènes précoces régulés par l'auxine. L'expression des gènes précoces induits par l'auxine dans les différents mutants insensibles à l'auxine chez *Arabidopsis* (*axr1*, *axr2* et *aux1*) et la tomate (*Lycopersicum* : *dgt*) peut ne pas être affectée (rond rayé horizontalement), être inhibée à différents degrés (rond rayé verticalement), ou ne pas être déterminé (n.d.). Les ARE (*AuxREs*) sont les points communs fonctionnels à au moins trois classes majeures de gènes et à ACC synthase (marqué par une ellipse remplie de gris). Les éléments ocs-like des gènes *GH2/4-like* sont signalés par un losange vide. Les gènes *SAUR* et *GH3-like* n'ont pas encore été reliés à une fonction précise (Abel et Theologis, 1996).

L'étude des plants d'*Arabidopsis* mutants résistants à l'auxine a permis également de découvrir d'autres gènes impliqués dans des réponses aux stress (revue dans Abel et Theologis, 1996). Parmi ces gènes on peut distinguer des éléments centraux de la signalisation de l'auxine tel que *AXR1*, *AXR2* ou dans le transport de l'auxine tel que *AUX1* et les gènes *PIN*.

2.4.2.2. Transduction du signal en réponse à l'auxine

De nombreuses études ont tenté de mettre en évidence les sites d'action directs de l'auxine. La plus caractérisée des protéines liant l'auxine est ABP1 (Scherer, 2002). Même si les variations dans l'expression de cette protéine ne provoquent que des variations phénotypiques bénignes (Jones, 1998 ; Baully *et al.*, 2000), c'est la cible la plus probable pour l'auxine au niveau de la membrane plasmique. Cependant sa localisation n'est pas exclusive et on la retrouve en grande proportion dans le réticulum endoplasmique où il pourrait être le point de départ d'une autre voie de signalisation en réponse à l'auxine (Napier *et al.*, 2002).

La transduction du signal de l'auxine intervient probablement par l'intermédiaire d'une protéine G trimérique dont la sous-unité $G\alpha$, puisque les RAC GTPases (sous unités $G\alpha$ potentielles) sont impliquées dans la signalisation en réponse à l'auxine (Tao *et al.*, 2002).

2.4.3 Le transport de l'auxine dans les racines

A l'exception des réponses de tropisme, l'auxine est connue pour réguler de nombreux aspects de la croissance et du développement des plantes, tels que la formation des racines et des tiges primaires et secondaires, la différenciation des tissus vasculaires, et le développement embryonnaire (revue dans Gilroy et Trewavas, 2001). Les mécanismes cellulaires, par lesquels une simple molécule d'auxine exerce tant d'effets, sont encore inconnus. Cependant, un aspect important dans la régulation de ces différents processus semble être lié aux différents gradients de concentrations d'auxine (Ishikawa et Evans, 1993).

2.4.3.1 Transport polaire et non-polaire

Deux façons différentes de percevoir le transport de l'auxine dans les racines sont connues : un transport rapide et non polaire, couplé avec le transport des métabolites (comme les sucres) dans le phloème et, un transport plus lent polaire évoluant dans les différents tissus

de la racine. Le transport non-polaire de l'auxine comprend le transport des conjugués d'auxine inactive, tandis que le transport polaire de l'auxine est restreint au passage de cellule à cellule des formes libres et actives de l'auxine. Les deux types de transport peuvent être liés directement ou indirectement (Cambridge et Morris, 1996), cependant le transport polaire de l'auxine est le principal mécanisme du transport de l'auxine (Lomax *et al.*, 1995). Le suivi, par des mesures quantitatives, de l'auxine radio-marquée ajoutée aux racines de manière exogène, révèle deux manières distinctes pour l'auxine d'évoluer dans les racines (Rashotte *et al.*, 2000) : le transport de l'auxine de la base de la tige vers l'apex de la racine dans les tissus vasculaires (transport acropétale de l'auxine) et le transport de l'auxine de l'apex de la racine vers la tige via les cellules épidermiques et corticales extérieures (transport basipétal de l'auxine) (Fig. 2.5) (Marchant *et al.*, 1999).

Les études sur des mutants affectant le transport de l'auxine suggèrent que le passage de cellule à cellule de l'IAA s'effectue par l'intermédiaire de complexes protéiques qui régulent les flux d'auxine vers l'intérieur ou l'extérieur des cellules. La direction du flux de l'auxine est déterminée par la présence et la localisation polaire des complexes protéiques aux sites de sortie de l'auxine. Le modèle biochimique de base du transport polaire de l'auxine suggère l'entrée non-chargée de IAA protoné (HIAA) de l'apoplasme acide par diffusion. Cependant, il a été démontré que l'auxine peut aussi être transportée efficacement par un système énergétique impliquant des transporteurs spécifiques pour l'influx de l'auxine à l'intérieur de la cellule (Rubery et Sheldrake, 1974). À cause du pH basique du cytosol, HIAA est déprotoné (IAA^-), et possède une faible perméabilité due à sa charge négative, il est donc piégé au sein de la cellule (Goldsmith, 1977). En conséquence, IAA^- ne peut quitter la cellule que par l'intervention d'un transport actif de l'intérieur vers l'extérieur de la cellule (Rubery et Sheldrake, 1974).

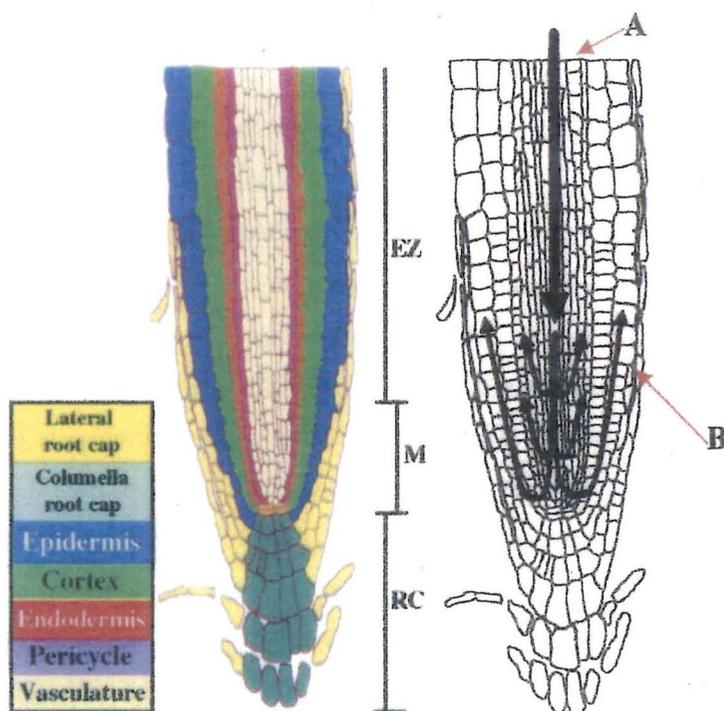


Figure 2.5 : Schéma du transport polaire de l'auxine dans les racines. À gauche, illustration schématique des tissus apicaux de racines délimitant la coiffe (RC), les zones méristématique (M) et d'élongation (EZ). À droite, modèle de circulation de l'auxine par le transport acropétal (A) et basipétal (B) (Marchant *et al.*, 1999).

L'efflux de l'auxine peut être distingué de l'influx par l'application d'inhibiteurs qui empêchent spécifiquement les activités des transporteurs cellulaires liés à l'influx ou à l'efflux de l'auxine, ou par des essais de formes synthétiques de l'auxine qui sont seulement des substrats pour un des types de transporteurs. Les auxines synthétiques utilisées pour ces mesures de transport de l'auxine sont l'acide 2,4-dichlorophenoxyacétique (2,4-D) et l'acide 1-naphthylacétique (N-1-AA) (composé lipophile), qui sont exclusivement transportés en impliquant l'activité des transporteurs liés à l'influx et à l'efflux d'auxine respectivement (Delbarre *et al.*, 1996).

2.4.3.2 Les protéines du transport polaire de l'auxine

2.4.3.2.1 Aux1

Les protéines agissant spécifiquement dans l'influx et l'efflux d'auxine ont été identifiées et des mutants possédant des gènes défectueux pour ces protéines ont été caractérisés. La protéine AUX1 est reconnue pour permettre l'influx d'auxine dans la cellule, tandis que les protéines PIN et plus précisément PIN2, présentes uniquement dans les tissus des zones corticales et épidermiques des racines, sont requises pour l'efflux d'auxine (Muday et Murphy, 2002). L'immunolocalisation de AUX1 et de certaines des protéines PIN (dont Atpin2) chez *Arabidopsis*, ont révélé la distribution spécifique et parfois polaire, le long de la route prévue pour le transport acropétal et basipétal de l'auxine en accord avec les précédentes hypothèses (Friml *et al.*, 2002b ; Gälweiler *et al.*, 1998 ; Swarup *et al.*, 2001). Le gène *AUX1*, chez *Arabidopsis*, code pour une protéine transmembranaire qui possède une homologie avec les perméases d'acides aminés chez les plantes, et paraît jouer un rôle dans l'influx de l'auxine (Bennett *et al.*, 1996). Une inactivation du gène *AUX1* cause la résistance à l'auxine et à l'éthylène, en plus d'affecter le gravitropisme dans les plantules d'*Arabidopsis* (Bennett *et al.*, 1996). La croissance agravitropique des racines est compensée par l'application de l'auxine synthétique 1-NAA perméable (ne passe pas par AUX1) à la membrane cellulaire, mais pas par l'application de 2,4-D, dépendant du système d'influx de l'auxine (Marchant *et al.*, 1999). La croissance caractéristique des racines du mutant *aux1* peut être copiée phénotypiquement en traitant des plantules d'*Arabidopsis* de type sauvage avec les inhibiteurs du système d'influx de l'auxine, le 1-NOA et le CHPAA (Parry *et al.*, 2001). L'immunolocalisation de protéines AUX1 marquées (liées à un antigène) dans les racines de plantules d'*Arabidopsis* transgéniques révèle une localisation polaire de la protéine à la pointe basale des cellules du protophloème (Swarup *et al.*, 2001).

2.4.3.2.2 Pin

Les protéines, codées par la famille des gènes *PIN*, chez *Arabidopsis*, sont constituées de 10-12 segments transmembranaires potentiels, et montrent des similarités avec des transporteurs chez les bactéries (revue en détail dans : Palme et Gälweiler, 1999). L'action des PIN dans le transport de l'auxine est maintenant fortement reliée à leur localisation (Fig. 2.6) (revue dans : Muday et Murphy, 2002). La localisation polaire des PIN est rendue possible par les vésicules d'attachement qui sont influencées par la gravité et par les filaments d'actine formés par le cytosquelette. Le dérèglement de l'un des deux protagonistes entraîne une altération de cette localisation et donc une perturbation du transport de l'auxine. Des mesures du transport de l'auxine ont révélé un transport basipétal inégal des deux côtés de la racine du mutant pour le gène *PIN2* (*Atpin2* : Rashotte *et al.*, 2000), connu aussi comme *EIR1*, *AGRI* ou *WAV6* (Luschnig *et al.*, 1998 ; Müller *et al.*, 1998). La plupart des membres de la famille *PIN* (8 gènes différents) sont exprimés dans les racines (*AtPIN1*, *AtPIN2*, *AtPIN3* et *AtPIN4*), cependant *PIN2* est exprimé spécifiquement dans la DZ. Le mutant *Atpin2* est porteur d'anomalies dans le gravitropisme et la croissance des racines. Cette mutation est accompagnée par une sensibilité réduite aux inhibiteurs du transport de l'auxine et à l'éthylène (Friml *et al.*, 2002b ; Müller *et al.*, 1998). Le mutant *Atpin3* montre des altérations du gravitropisme et de la croissance au niveau des racines mais aussi dans d'autres tissus (Friml *et al.*, 2002a). Enfin les mutants *Atpin1* et *Atpin4* ne montrent pas de déficiences au niveau de la croissance ou du gravitropisme mais dans le développement embryonnaire des racines (Blilou *et al.*, 2005).

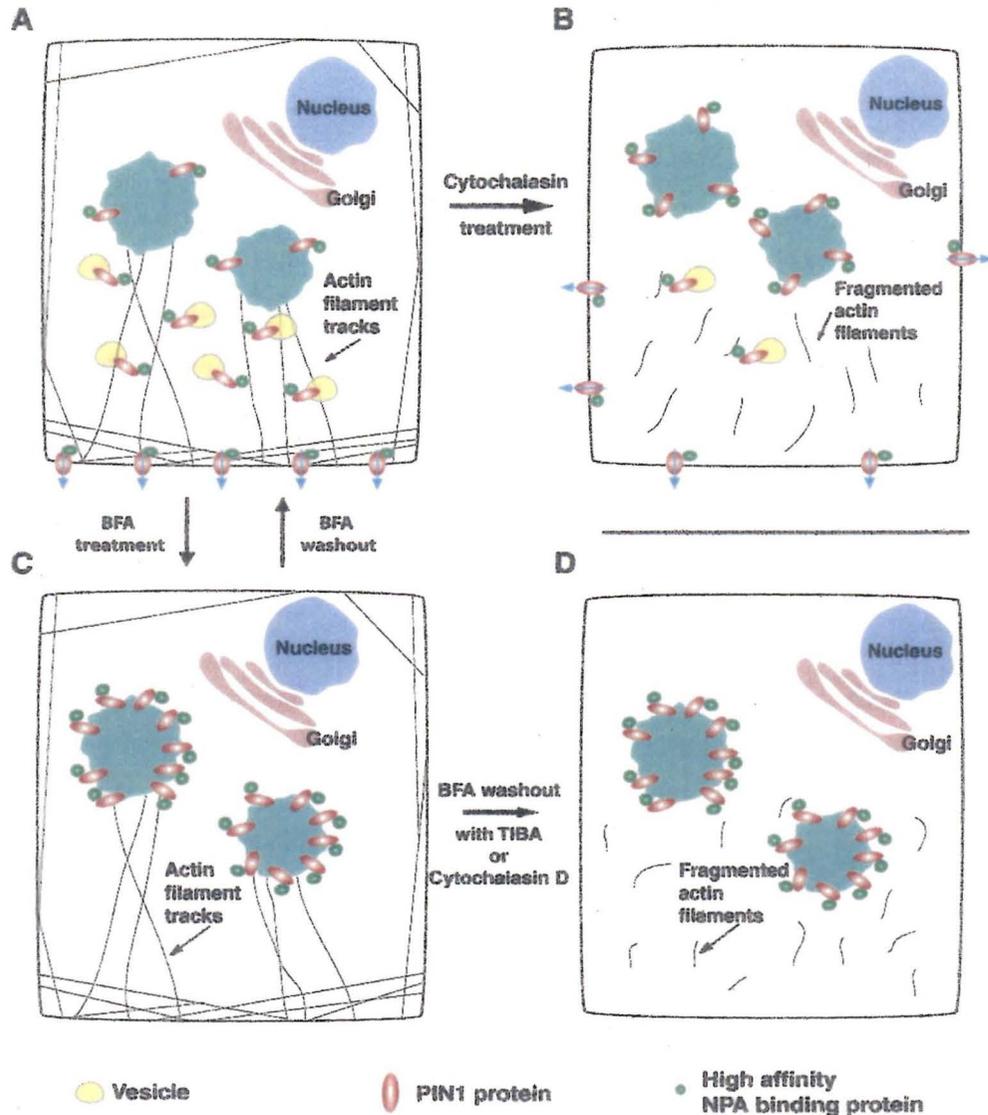


Figure 2.6 : Modèle des expériences qui ont examiné les mécanismes de contrôle de la localisation des protéines PIN1.

(A) Le transport de la protéine PIN1 à la membrane basale, dépend des vésicules et s'effectue par l'intermédiaire des filaments d'actine. Une protéine NPA-binding a montré une interaction avec l'actine et pourrait agir comme intermédiaire entre le transport des vésicules et des fuseaux d'actine et /ou pourrait servir à localiser les complexes associé à PIN1 à la membrane basale. (B) Un traitement avec la cytochalasin conduit à une distribution aléatoire des protéines PIN1 et à une réduction du transport polaire de l'auxine. (C) Un traitement avec la brefeldin A (BFA) conduit à une perte des protéines PIN1 sur la membrane basale. Cet effet est réversible. (D) Un traitement avec la cytochalasin ou avec l'inhibiteur de l'efflux d'IAA TIBA, après le traitement au BFA, prévient la restauration de la distribution asymétrique des protéines PIN1 (Muday et Murphy, 2002).

2.4.3.3. La régulation de l'influx d'auxine dans les cellules

Le transport de l'auxine de manière perméable est permis comme vu plus haut par la protonation des formes actives IAA⁻ et peut être fortement influencé par l'activité ou l'inhibition des pompes à H⁺ et plus particulièrement les H⁺-ATPases. Les inhibiteurs spécifiques de l'influx (1-NOA et CHPAA) ont permis l'analyse de la fonction des composants intervenant dans l'influx de l'auxine (Parry *et al.*, 2001).

2.4.3.4 La régulation des gènes *PIN* (régulation de l'efflux)

Les mécanismes précis pour la régulation des gènes *PIN* ne sont pas encore connus et aucun facteur de transcription des gènes *PIN* n'a encore été identifié. Il y a cependant, une évidence quant à la régulation des niveaux de transcrits, puisque des analyses northern effectuées avec des sondes spécifiques de *AtPin2* révèlent une induction du gène par le 1-NAA dans les racines d'*Arabidopsis* (Ottensschläger, 2002).

Son activité est également régulée, au niveau post-traductionnel, par le trafic de vésicules responsables de la localisation polaire des PIN. Les études employant des inhibiteurs de ces transporteurs ont conduit à l'hypothèse suivant laquelle les mouvements de l'auxine seraient régulés par un complexe protéique de 2 ou 3 sous-unités synthétisées indépendamment (Muday et Murphy, 2002). L'efflux de l'auxine est sensible à des inhibiteurs du trafic intracellulaire de vésicule et de la synthèse de protéines, indiquant qu'au moins un composant de l'efflux est de courte durée de vie (Morris *et al.*, 1991 ; Delbarre *et al.*, 1998 ; Morris et Robinson, 1998).

Dans les embryons du mutant *gnom*, le trafic des vésicules est perturbé et l'activité de liaison à la membrane de PIN est perdue (Steinmann *et al.*, 1999). GNOM a été identifié comme une protéine démontrant une activité GAP (guanine nucleotide exchange) pour des

ARF (auxin responsive factors) GTPases. Ces petites GTPases sont connues pour jouer un rôle dans le contrôle du trafic des vésicules dans les mécanismes de localisation polaire des protéines PIN (Steimann *et al.*, 1999). Plus récemment, une famille de GTPases, Rho/Rac, a été impliquée dans la transduction de la signalisation en réponse à l'auxine (Tao *et al.*, 2002) et dans la régulation du transport polaire de l'auxine (Ottenschläger, 2002 ; Tao *et al.*, 2002).

Plusieurs composants synthétiques, comme l'acide naphthylphthalamique (NPA), bloquent le transport polaire de l'auxine et les réponses de la croissance dépendantes de l'auxine en inhibant l'efflux de l'auxine (Rubery, 1990; Muday, 2000). Des métabolites endogènes comme les flavonoïdes ont été suggérés comme agissant en tant que régulateurs naturels du transport de l'auxine par leur interaction avec les *NPA-binding* protéines (Jacobs et Rubery, 1988). Les PINOID sont des *npa-binding* protéines et des sérine/thréonine kinases, connues pour interagir avec les protéines PIN (Benjamins *et al.*, 2001). Différents travaux leur attribuent une fonction régulatrice dans la localisation polaire des PIN. Des études ont démontré, que la sur-expression de ces protéines agissait en régulateur négatif de signalisation de l'auxine (Christensen *et al.*, 2000) et en régulateur positif du transport de l'auxine (Benjamins *et al.*, 2001).

2.4.4. Modèle d'interaction entre le transport polaire de l'auxine et la signalisation en réponse à l'auxine

L'auxine agirait donc par gradient de concentration dans les cellules, en contrôlant positivement son propre transport polaire, de façon à ne pas maintenir une concentration trop élevée dans les cellules. Dans le cas d'une accumulation d'auxine, les cellules sont caractérisées par une hausse significative de la signalisation cellulaire en réponse à l'auxine et une inhibition de croissance racinaire. Cette propriété caractérisée pour la sur-expression des PINOID (Christensen *et al.*, 2000 ; Benjamins *et al.*, 2001), est également ciblée de manière vague pour les RAC GTPases. La sur-expression de *NtRAC1* sous forme constitutivement active permet une hausse significative de la signalisation en réponse à l'auxine, de même que des phénotypes caractéristiques des mutants au transport de l'auxine :

pin-like, *mp-like*, *gnom-like* (Tao *et al.*, 2002). L'induction, plus importante des gènes induits en réponse à l'auxine, est à mettre en opposition avec une amélioration du transport polaire de l'auxine qui caractériserait une baisse de l'accumulation de l'auxine dans les cellules. Suivant ce modèle, une accumulation d'auxine, due à une déficience dans son transport polaire, conduirait à une inhibition de croissance racinaire via une activation trop importante de la signalisation de l'auxine.

2.5 L'éthylène

L'hormone gazeuse éthylène est un hydrocarbure oléfine produit par toutes les plantes. Malgré sa structure chimique simple, elle orchestre une myriade de fonctions complexes. L'éthylène contrôle des processus aussi divers que la germination, le développement des racines secondaires, la nodulation des racines, la sénescence des fruits (incluant le pourrissement), la croissance différentielle des cellules, l'abscission, la réponse aux stress et la résistance aux pathogènes nécrotrophiques. Il est connu que l'éthylène est efficace pour induire des réponses à des concentrations nanomolaires et que ces réponses ne prennent que quelques minutes pour être induites. En raison de cet important potentiel pour la signalisation, la production de cette hormone est régulée de manière très précise, contrôlée en parallèle par des signaux de développement et des réponses aux stimuli environnementaux (Davies, 2004).

2.5.1 Régulation des gènes de synthèse de l'éthylène

L'éthylène est essentiel pour le développement normal des plantes, leur croissance et leur survie. Cette hormone intervient dans signalisation sous-jacente à la germination des graines, au développement des fleurs et des fruits, dans l'induction de certains mécanismes de défense et en interaction avec de nombreuses hormones végétales.

L'éthylène est produit dans la plupart des tissus végétaux (Yang et Hoffman, 1984). Sa biosynthèse commence à partir de la S-adenosylméthionine (SAM), le précurseur ubiquiste des méthylation dans de nombreuses autres voies métaboliques, ce qui permet d'expliquer qu'elle soit retrouvée en abondance dans les tissus végétaux. L'ACC synthase (ACS) convertit la SAM en 1-aminocyclopropane-1-carboxylique acide (ACC) et 5-méthylthioadénosine (MTA). Il a été suggéré que cette étape serait limitante pour la biosynthèse de l'éthylène (Yang et Hoffman, 1984). L'ACC synthase est codée par une famille multigénique et la transcription des différentes formes est induite par différentes conditions environnementales ou physiologiques (Theologis, 1992). Chez la tomate, 9 isoformes ont été identifiées (Vogel *et al.*, 1998).

L'étape suivante est la conversion de l'ACC en éthylène par l'ACC oxydase, enzyme présente dans la plupart des tissus en faible quantité. Comme pour l'ACC synthase, plusieurs isoformes d'ACC oxydase ont été identifiées et sont constitutives dans la plupart des tissus même si une induction a pu être parfois identifiée (revue dans Davies, 2004).

2.5.2 Transduction du signal de l'éthylène

Le décryptage des étapes impliquées dans la perception de l'éthylène et la transduction du signal a évolué très rapidement et a mené à une vision de plus en plus intégrée chez *Arabidopsis* (Guo et Ecker, 2004 ; Fig. 2.7).

Chez *Arabidopsis*, l'éthylène peut être perçue par 5 récepteurs regroupés en 2 types. ETR1 et ERS1 (Type 1) possèdent un domaine histidine kinase fonctionnel tandis que pour ETR2, ERS2 et EIN4 (Type 2) ce domaine n'est pas fonctionnel. Cependant ce domaine ne semble pas requis pour la transmission du signal (Wang *et al.*, 2003). L'activité histidine kinase est probablement conservée pour d'autres fonctions impliquées dans la localisation et la stabilité de la protéine ou dans une régulation plus fine du signal. Le domaine histidine kinase dégénéré des récepteurs de type 2 se comporte probablement en tant que ser/thr kinases comme cela a pu être observé chez le tabac (Xie *et al.*, 2003).

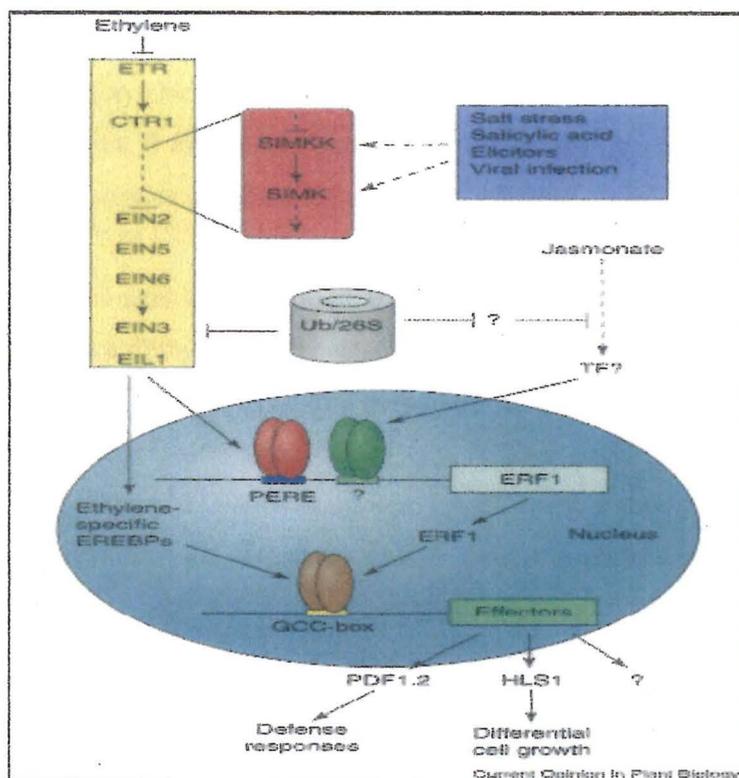


Figure 2.7 : Modèle pour la voie de transduction du signal de l'éthylène et la régulation de l'expression des gènes.

L'éthylène bloque par fixation l'interaction d'une famille de ER-associated-receptors (ETR) et CTR1 qui est un répresseur de la signalisation. Un modèle de MAPK, composé par SIMKK et SIMK est proposé pour agir en aval de CTR1. Cependant les mécanismes biochimiques impliquant cette voie MAPK sont encore obscurs. Étant donné que beaucoup de stimuli biotiques ou abiotiques activent la voie SIMKK/SIMK, il semble que leur activation soit dépendante de la fonction des récepteurs et de CTR1. Les éléments en aval de la signalisation de l'éthylène sont représentés par plusieurs régulateurs positifs (EIN2, EIN5, EIN6 ainsi que les facteurs de transcriptions EIN3 et EIL1). La quantité de protéine EIN3 est contrôlée par l'éthylène, possiblement via le complexe protéasomique (Ub/26S). La première voie de signalisation de l'éthylène (indiquée en jaune) est nécessaire pour toutes les réponses connues à l'éthylène et sont dépendantes du niveau protéique des EIN3/EIL1. Plusieurs facteurs de transcription sont connus pour être des cibles directes de EIN3/EIL1, qui peuvent se lier à un élément de réponse primaire de l'éthylène (PERE) sur les promoteurs des gènes répondant à l'éthylène (EREBP). ERF1 (un gène EREBP) est également impliqué dans la régulation de gènes induits par l'acide jasmonique. Des EREBP peuvent agir de manière à intégrer les signaux de l'éthylène et/ou d'autres hormones. De nombreuses protéines EREBP sont connues pour réguler l'expression des gènes via une interaction par des éléments en cis appelé GCC-BOX, qui est retrouvé pour de nombreux gènes induits par l'éthylène tel que *PDF1.2* et *HOOKLESS1 (HLS1)*. Les flèches et les traits barrés représentent des inductions et des répressions respectivement. Lorsque deux éléments sont liés par une ligne, ces deux éléments sont en interaction directe (Guo et Ecker, 2004).

Les composés phosphorylables intervenant en aval des récepteurs à activité ser/thr sont à l'heure actuelle inconnus. Il est supposé qu'ils interviennent dans la voie de transduction du signal, puisque ces récepteurs sont fonctionnels (Xie *et al.*, 2002 ; Tieman *et al.*, 2000).

ETR1 a été récemment localisé sur les membranes du réticulum endoplasmique (Chen *et al.*, 2002). En absence d'éthylène les récepteurs sont liés à une protéine CTRL (Constitutive Triple Response 1). CTRL est composé d'un domaine N-terminal de fonction inconnue mais qui est nécessaire à l'interaction avec le récepteur (Huang *et al.*, 2003). Le domaine C terminal est homologue aux **MAPKKK** Raf. Bien que non requis pour interagir avec CTRL, les domaines histidine kinase des récepteurs de type 1 ont une meilleure affinité avec CTRL que les domaines ser/thr kinase des récepteurs de type 2 (Gao *et al.*, 2003). Chez les mutants dont la fonction CTRL est perdue, une activation constitutive de la réponse à l'éthylène est observée. CTRL exercerait donc un contrôle négatif lorsqu'il est lié au récepteur et serait inactif quand il en est dissocié (Kieber *et al.*, 1993 ; Huang *et al.*, 2003). L'activité kinase de CTRL a été identifiée récemment (Huang *et al.*, 2003) et une cascade de MAP-Kinase a été décrite comme étant impliquée dans la réponse à l'éthylène en aval de CTRL ; une MAPKK (SIMKK) active une MAPK (MAPK6), toutes deux sont induites par l'éthylène (Ouaked *et al.*, 2003). Le lien entre SIMKK et CTRL reste cependant à démontrer de façon formelle. Ces derniers auteurs ont proposé cette hypothèse en observant le même phénotype en surexprimant **SIMKK** et en supprimant CTRL. **SIMKKK** pourrait être activé via le récepteur ETR1 en absence de CTRL.

Le rôle de la protéine potentiellement suivante dans la cascade de transduction du signal, EIN2 est à l'heure actuelle obscur. Les données de génétique indiquent que CTRL serait un régulateur négatif de l'induction de *EIN2* et des facteurs de transcription de type *EIN3/EIL* (Roman *et al.*, 1995). *EIN2* agirait sur une série de facteurs de transcription, *EIN3* et la famille *EIL1* (Solana *et al.*, 1998). Cependant aucun gène *EIN3/EIL1* identifié n'a été observé comme étant régulé au niveau du transcriptome par l'éthylène, et *EIN3/EIL1* doit subir des modifications post-traductionnelles par protéolyse via 2 protéines F-box (EBF1 et EBF2) (Guo et Ecker, 2003 ; Yanagisawa *et al.*, 2003).

2.5.3 L'auxine et l'éthylène

Les interactions entre les deux hormones sont étudiées depuis longtemps et plusieurs corrélations étaient déjà connues il y a 35 ans. Kang *et al.* (1971) avait déjà montré l'induction de l'éthylène par l'application d'auxine exogène sur les pointes de racines. Les expériences de Yoshii et Imaseki (1981) ont montré que l'auxine augmentait l'activité enzymatique ACS et la quantité d'ACC. Cependant l'action de l'auxine et même l'inhibition de croissance des racines par l'auxine ont pu être identifiées indépendamment de l'influence de l'éthylène en utilisant des inhibiteurs de la synthèse de l'éthylène (Eliasson *et al.*, 1989).

Plus récemment, le criblage génétique pour des mutants possédant des réponses aberrantes à l'application d'éthylène a permis d'identifier des mutations sur des gènes impliqués dans la signalisation de l'auxine. Le premier découvert est le mutant *hookless1* (*hls1*) (Guzman et Ecker, 1990). Les mutants *hls1* ne répondent plus par une croissance altérée dans la zone apicale de l'hypocotyle lorsqu'ils sont exposés à l'éthylène : ces plantes ne forment pas de crochet apical en présence d'éthylène. Ces mutants montrent également un élargissement anormal des cellules de l'hypocotyle et dans les cotylédons. Cette perte peut être copiée phénotypiquement lorsque les plantules sont traitées avec de l'auxine ou des inhibiteurs du transport de l'auxine, suggérant des relations croisées entre la signalisation de l'auxine et celle de l'éthylène (Stepanova et Ecker, 2000). D'autres mutants qui agissent dans des tissus spécifiques et qui sont impliqués dans la signalisation de l'auxine tels que les trois mutants *axr1-3*, *aux1-7*, *eir1-1* possèdent tous les trois une insensibilité à l'éthylène dans les racines (Alonso et Ecker, 2001).

D'une manière plus générale, les voies d'induction et de signalisation de l'auxine et de l'éthylène sont complexes et peuvent utiliser des voies communes ou indépendantes l'une de l'autre pour de nombreux stimuli. Cependant, l'AI n'a pas encore été caractérisé à l'aide de mutants afin de distinguer les différences possibles dans les voies associées aux réponses toxiques causées par cet élément.

2.6 Synthèse et objectifs de recherche

2.6.1 Synthèse

Il a été démontré que l'Al bloque le transport de l'auxine et provoque une accumulation de cette hormone dans les pointes de racines (Hasenstein et Evans, 1988; Kollmeier *et al.*, 2000). D'autre part, l'inhibition de croissance causée par l'accumulation d'auxine est souvent associée à l'action conjointe ou induite de l'éthylène. Ces mécanismes intervenant dans la croissance ont été mis en évidence à plusieurs reprises à l'aide de différents mutants chez *Arabidopsis*. La mutation conférant une résistance à l'une des hormones a été souvent associée à une résistance pour l'autre hormone (Rahman *et al.*, 2001; Alonso et Ecker, 2001). Dans les racines, la production de ROS a déjà été corrélée avec l'inhibition de croissance provoquée par l'auxine (Joo *et al.*, 2001) ou l'éthylène (Lee et Lin, 1996) dans les racines.

Plusieurs gènes induits par l'Al ont été associées à une réponse aux pathogènes ou au stress oxydatif (Hamel *et al.*, 1998; Richards *et al.*, 1998) mais sans montrer de différence d'expression entre les cultivars sensibles et tolérants pour des ICR comparables. Cependant, les voies d'action de l'auxine et de l'éthylène peuvent converger vers une interaction et une réponse commune (Stepanova et Ecker, 2000). Leur mode de transport et de signalisation sont toutefois très différents (voir 2. État des connaissances).

2.6.2 Hypothèses

L'accumulation d'auxine dans les pointes de racines provoquée par la toxicité de l'aluminium pourrait activer l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la synthèse et la signalisation de l'éthylène et de l'auxine.

D'autre part, l'inhibition du transport de l'auxine par l'Al provoque l'accumulation d'auxine dans la zone d'élongation racinaire (Hasenstein et Evans, 1988; Kollmeier *et al.*, 2000), et pourrait être responsable de l'inhibition de croissance.

2.6.3 Objectifs

Le métabolisme de l'auxine et de l'éthylène pourrait être perturbé par l'Al et mener à l'arrêt de la croissance des racines. Afin d'évaluer les impacts de l'Al sur la synthèse d'auxine, nous avons évalué l'expression des deux gènes principaux impliqués dans la synthèse d'éthylène soit l'ACC synthase (*Acs*) et l'ACC oxydase (*Aco*). On a tout d'abord réalisé des tests de qRT-PCR sur les gènes impliqués dans la synthèse de l'éthylène *Acs* et *Aco* à partir des pointes de racines des cultivars de blé sensible (Bounty) et tolérant (Atlas) exposés à différentes concentrations d'Al. Les séquences disponibles dans les banques d'EST's ont été utilisées pour dessiner les amorces.

En second lieu, nous avons analysé les profils d'expression des séquences provenant d'une puce à ADN et identifié les séquences impliquées dans les réponses moléculaires à l'auxine et l'éthylène. Nous avons effectué des tests de qRT-PCR sur les séquences sélectionnées afin de confirmer leur profil d'expression dans les pointes de racines des cultivars de blé sensible et tolérant exposés à différentes concentrations d'aluminium.

Des mutants résistants à l'auxine *aux1-7*, *eir1-1*, *tir1-1* et *axr1-3* ont été utilisés pour vérifier si l'arrêt de croissance causé par l'Al pouvait être dû à une accumulation d'auxine ou d'éthylène. Nous avons donc combiné les approches méthodologiques de Larsen *et al.* (1996) et le protocole de mesure de pointes de racines sur Pétri (Weigel *et al.*, 2002), pour élaborer ce nouveau modèle de mesure.

3. MATÉRIEL ET MÉTHODES

3.1 Aspects physiologiques

3.1.1 Matériel végétal et conditions de croissance :

Les cultivars de blé *Triticum aestivum* L. cv. Atlas66 (tolérant à l'Al) et *Triticum aestivum* L. cv. Bounty (sensible à l'Al) sont utilisés pour leur réponse à l'Al. Les grains de blé de ces cultivars sont semés dans de la vermiculite maintenue saturée en eau distillée. La croissance des plantules est effectuée sous un éclairage artificiel ($25 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) ininterrompu et une température constante de 23°C pour une période de 72 à 96 heures.

Avant l'exposition, les plantules de blé sont lavés dans une solution de CaCl_2 1mM (pH 6.5) afin d'en retirer le maximum de vermiculite. Ensuite la totalité des racines sont transférées dans la solution d'Al appropriée contenant de 0 à 250 μM d'Al, 1mM CaCl_2 (pH 4.15 ajusté avec du HCl 1M). Les mêmes conditions de croissance (lumière et température), que celles utilisées pour les semences, sont utilisées.

Les grains des variétés d'*Arabidopsis thaliana* mutants *aux1-7*, *eir1*, *axr1-3*, *tir1-1* et le témoin sauvage col-0 ont été retenus pour effectuer des mesures de croissance racinaire lors d'exposition à l'Al. Ils ont tous des mutations pour des gènes qui sont soit impliqués dans le transport de l'auxine (AUX1 et PIN2) ou dans la signalisation de l'auxine (AXR1 et TIR1). Ils possèdent presque tous (à l'exception de *tir1.1*) une résistance plus grande en comparaison du type sauvage face à l'éthylène et sont résistants à l'auxine et/ou possèdent un comportement gravitropique altéré (Tableau 3.1).

Les grains d'*Arabidopsis* sont lavés et stérilisés dans de l'alcool 100 % pendant 5 min, lavés dans une solution contenant 2.65 % d'hypochlorite de sodium (stock à 5.3 %) et 0.05 % [v/v] de Tween20 pendant 30 min, et enfin rincées 3-4 fois dans de l'eau distillée stérile.

Tableau 3.1 : Description des mutants d'*Arabidopsis* utilisés.

Les mutants sont rattachés à leur propriétés physiologique (résistance à l'auxine et à l'éthylène, gravitropisme) et au gène altéré.

Nom du mutant	Résistant à l'auxine	Résistant à l'éthylène	Nom du gène	Agravitropisme
<i>aux1-7</i>	OUI	OUI	<i>AUX1</i>	OUI
<i>eir1.1</i>	NON	OUI	<i>PIN2</i>	OUI
<i>tir1.1</i>	OUI	—	<i>TIR1</i>	OUI
<i>axr1.3</i>	OUI	OUI	<i>AXR1</i>	NON

Les grains stérilisés sont étalés par 20-30 sur Pétri circulaire (150 x 25mm) contenant 0.8 % d'agar (sans phosphate) 2 mM KNO₃, 0.2 mM KH₂PO₄, 2 mM MgSO₄, 0.25 mM, (NH₄)₂SO₄, 1 mM Ca(NO₃)₂, 1 mM CaSO₄, 1 mM K₂SO₄, 1 μM MnSO₄, 5 μM H₂BO₃, 0.05 μM CuSO₄, 0.2 μM ZnSO₄, 0.02 μM NaMoO₄, 0.1 μM CaCl₂, 0.001 μM CoCl₂, et 1 % saccharose. Les milieux sont préalablement conditionnés pendant 2 jours dans une solution contenant les mêmes composants à l'exception de 0.1 mM KH₂PO₄, 1.1 mM K₂SO₄ et 0 à 400 μM d'Al (Larsen *et al.*, 1996). Les concentrations finales d'Al sont considérées la moitié des concentrations utilisées pour les solutions de trempage qui est d'un volume équivalent à celui de la gélose.

Les grains sont ensuite stratifiés sur les milieux d'exposition à 4°C et à l'obscurité pendant 4 jours afin de synchroniser la germination, puis les Pétri sont mis en chambre de culture *in vitro* suivant une inclinaison de 45° à une température de 20°C et un cycle jour/nuit de 16 h/8 h pendant 6 jours sous une intensité lumineuse de 50 μmol.m⁻².s⁻¹.

3.1.2 Relevé des mesures

Pour *Triticum aestivum*, l'inhibition de la croissance des racines est évaluée en comparant l'allongement moyen des racines traitées avec celui du groupe témoin et exprimée en ICR (Inhibition de la Croissance Racinaire). L'ICR est exprimée en pourcentage selon la formule suivante : $ICR = 100 \times [1 - (\text{croissance des plants traités} / \text{croissance des plants témoins})]$.

Pour les plantules d'*Arabidopsis*, les relevés de mesures de racines sont effectués par prises de photo à 4 jours et 6 jours d'exposition des Pétri dans les salles de croissance *in vitro*. La dimension, l'orientation et le contraste de la photo prise au jour 4 sont ensuite modifiés à l'aide du logiciel photoshop6.0 afin de superposer la photo au jour 4 à celle du jour 6 pour chaque Pétri et de pouvoir prendre la mesure de la croissance de chaque plantule pour les 2 jours de croissance additionnelle (Fig. 3.1). À l'aide du logiciel ImageJ, qui permet de mesurer la longueur des racines malgré les incurvation (Fig. 3.1), on a pu mesurer les racines des différentes lignées d'*Arabidopsis* pour des expositions à des concentrations variables d'Al. Les mesures ont été effectuées sur 20 à 30 plantules pour chaque mutant et chaque concentration d'Al testée. Les expériences ont été répétées 6 fois pour les analyses statistiques.

Les mesures de graines n'ayant pas germé ou n'ayant pas suivi la surface de la gélose ont été éliminées des données. Les données finales ont été normalisées et analysées par Anova à l'aide du logiciel GraphPad InStat 3 afin de déterminer les corrélations entre les différents mutants et entre les différentes concentrations d'Al auxquelles les plantules ont été exposées.

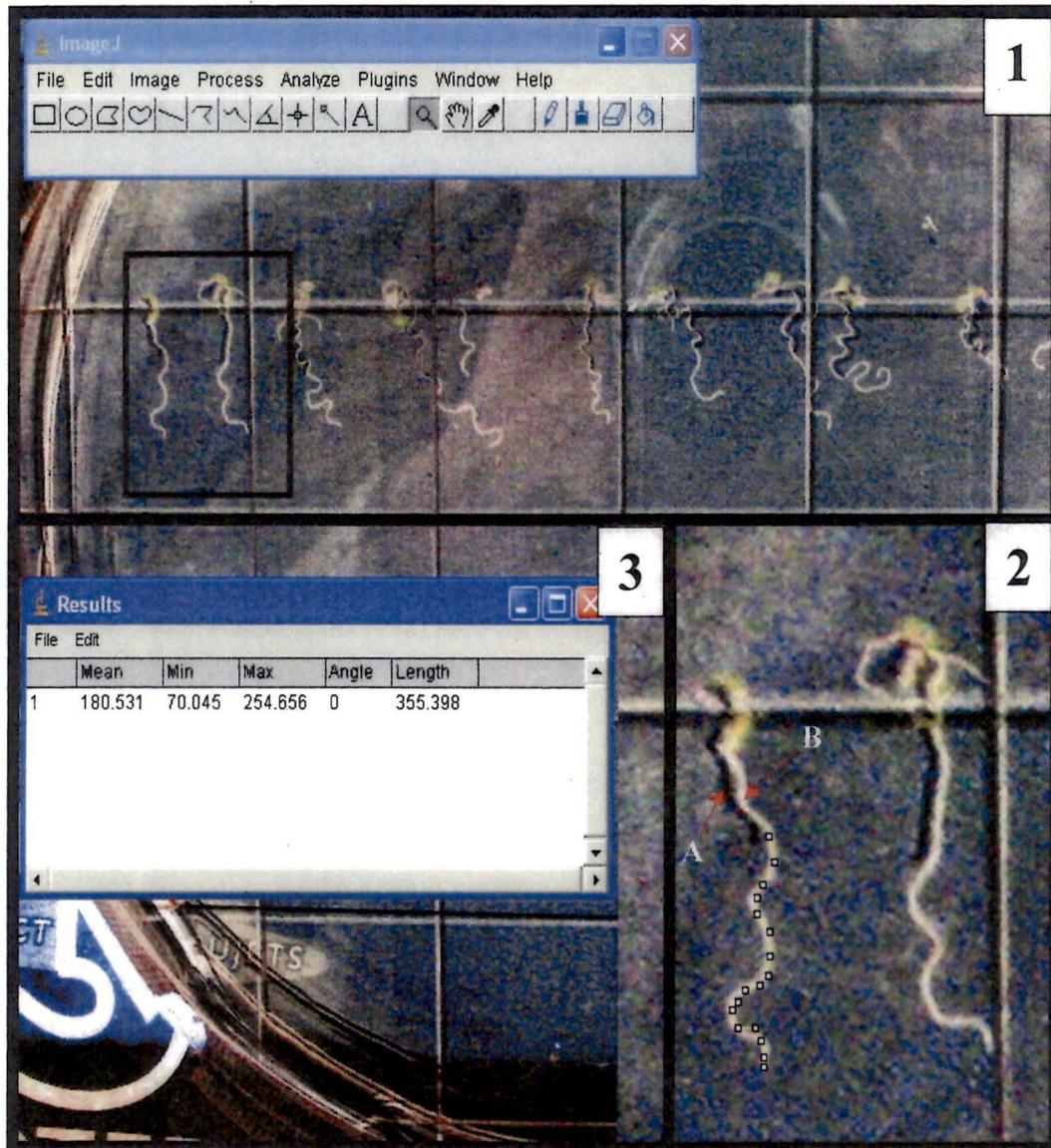


Figure 3.1 : Modèle de photo modifiée pour la mesure des croissances racinaires chez *Arabidopsis*.

La partie (1) représente la superposition des photos au jour 4 et au jour 6. La photo au jour 4 dont le contraste est inversé (en noir) est alignée sur la photo au jour 6.

La partie (2) montre un agrandissement de deux plantules encadré dans (1). Le plantule au jour 4 contrasté est indiqué par une flèche rouge (A), tandis que le plantule au jour 6, non-contrasté est indiqué par (B).

La prise de mesure sur la racine du jour 6 à partir de l'extrémité de la racine est indiqué par des points (2) qui cumulent plusieurs segments pour mesurer la croissance de la racine entre le jour 4 et le jour 6. La calibration de la mesure est effectué à l'aide du quadrillage présent sur les Pétri (1 carré = 2 cm) (cadre bleu titré *Results*) (3).

3.2 Biologie moléculaire

3.2.1 Extraction d'ARN chez le blé

Les pointes de racines (5-10mm) de blé ont été coupées après une exposition à différentes concentrations d'Al et gelées sur de la glace sèche. Les pointes ont été broyées dans l'azote liquide et l'ARN total a ensuite été isolé en utilisant le Qiagen RNeasy Plant Mini Kit avec l'étape optionnelle de traitement à la RNase-Free DNase Set (cat. no. 79254; Qiagen, Canada).

La qualité des ARN a été testée sur gel d'agarose et la réponse physiologique des séries d'ARN extraites a été validée avec le gène associé au stress *war13.2* (oxalate oxydase « *Oxo* »; Hamel *et al.* 1998) par PCR en temps réel.

3.2.2 Transcription inverse et quantité d'ADNc théorique

Trois µg d'ARN et 1 µg d'amorce « random hexamer » sont dénaturés à 65 °C pendant 10 min et immédiatement refroidis sur glace. Le premier brin d'ADNc est synthétisé dans un mélange réactionnel de 20 µl contenant du DTT 5 mM, dNTPs 0.5 mM, 50 U SuperscriptTM II RT (Invitrogen, Canada) et du tampon RT Buffer 1 X à 42 °C pendant 1 h. La réaction est arrêtée par dénaturation de l'enzyme à 70 °C pendant 15 min puis refroidie sur de la glace. Enfin les traces d'ARN sont éliminées par un traitement avec 1 U de RNase H (Invitrogen) de 20 min à 37°C.

Dans le reste du mémoire la quantité d'ADNc théorique est considérée comme étant la rétro-transcription de 100 % des ARN. À chaque fois que l'on parle de quantité d'ADNc, c'est par rapport à la quantité d'ARN qui a été utilisée initialement.

3.2.3 PCR en temps réel

3.2.3.1 Principe et modèle analytique

La PCR en temps réel (qRT-PCR) est basée sur les propriétés cinétiques de la réaction PCR. La quantification de la réaction PCR est obtenue à chaque cycle grâce au réactif SYBR GREEN, un agent qui fluoresce en s'intercalant dans les doubles brins de l'ADNc synthétisé (Fig. 3.2).

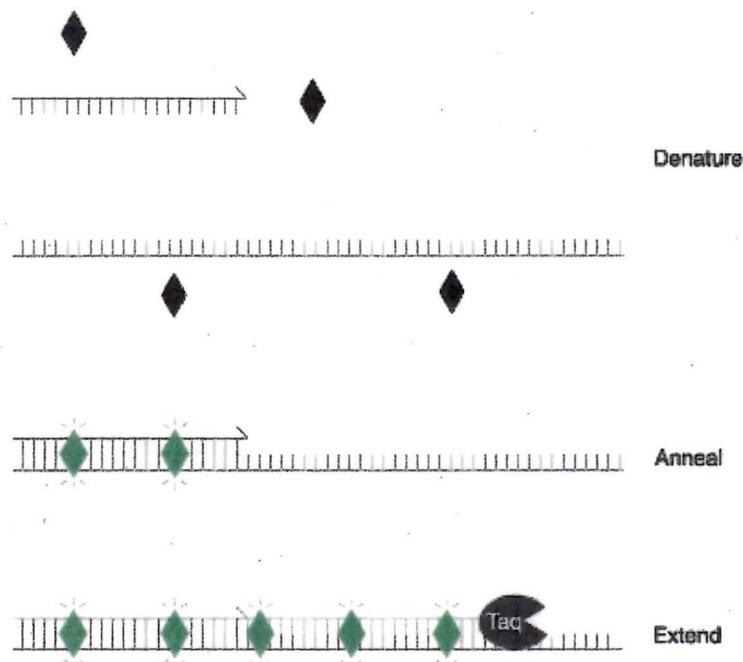


Figure 3.2 : Modèle explicatif de la fluorescence du SYBR GREEN.

Les molécules de SYBR GREEN ne fluorescent pas (losange noir) lorsqu'elles ne sont pas intégrées dans les doubles brins d'ADNc

À partir de chaque échantillon, un seuil est déterminé. Le cycle du seuil « cycle Threshold » (CT) correspond à l'intersection du seuil et de la courbe d'amplification PCR. Cette intersection est choisie pour couper la courbe au début de sa phase exponentielle. D'autre part, La molécule fluorescente ROX présente dans le mélange de réaction n'est pas affectée par la réaction d'amplification et permet de normaliser le signal de fluorescence de SYBR (Fig. 3.3).

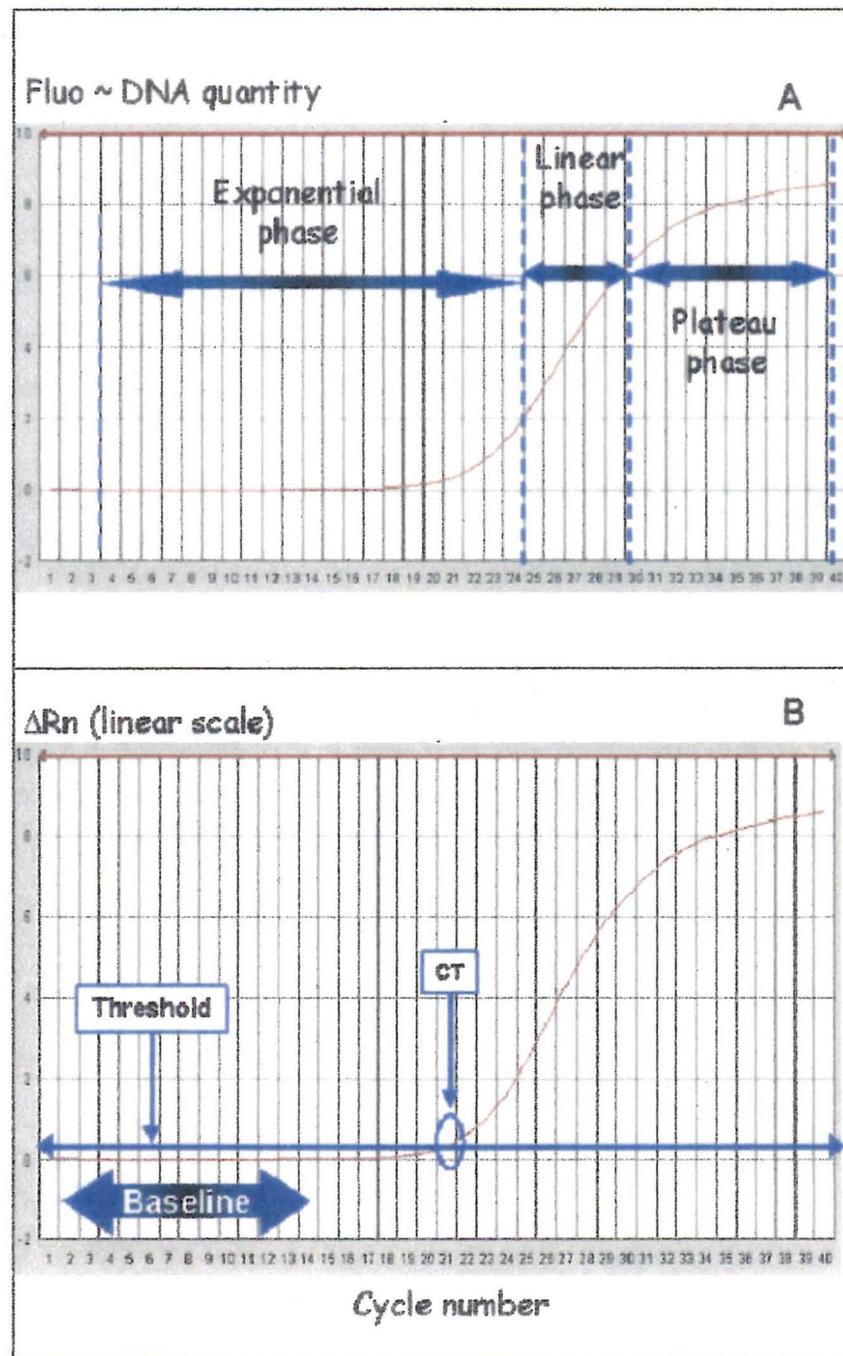


Figure 3.3 : Courbe d'amplification typique de PCR.

(A) La courbe est segmentée par des pointillés montrant les 3 phases (exponentielle, linéaire et plateau). (B) Dans le PCR en temps réel, la courbe d'amplification est caractérisée par le seuil (threshold) et le cycle du seuil CT. Pour les figures A et B, le nombre de cycle est

représenté en abscisse et le niveau de fluorescence (ou quantité d'ADN amplifié) en ordonnée.

Durant la phase exponentielle, l'équation de l'amplification PCR est :

$$X_n = X_0 \times (1+EX)^n \quad (1)$$

Où :

X_n est le nombre de fragment d'ADNc du gène cible au cycle n

X_0 est le nombre initial de fragment d'ADNc du gène cible

EX est l'efficacité d'amplification de fragment d'ADNc du gène cible.

Dans le cas d'une efficacité de 100 % ($EX = 1$), l'équation (1) nous donne :

$$X_n = X_0 \times 2^n$$

Cette équation montre que le nombre de produits PCR double à chaque cycle durant la phase exponentielle lorsque la PCR a une efficacité de 100 %.

La droite standard est relative quand elle est réalisée avec un mélange d'ADNc dans la concentration initiale d'ARN spécifique est inconnue. La concentration maximale est ainsi considérée égale à 1. Cependant c'est la manière la plus commune de réaliser les courbes standard, à noter que l'utilisation de la transformation par le \log_2 à la place du \log_{10} donnera une pente de 1 pour les calculs ultérieurs (Fig. 3.4B).

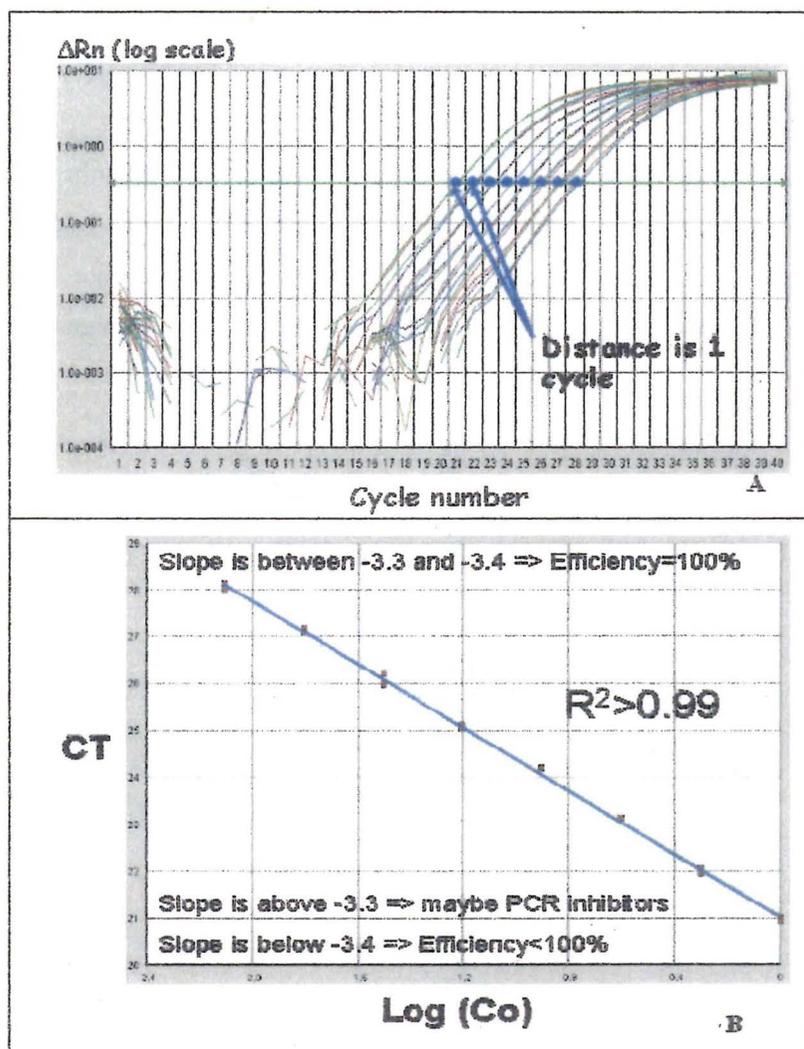


Figure 3.4 : Courbe de dilution et sa droite dérivée pour une série de dilution par 2.
 (A) Chaque dilution de 2 est représentée par un décalage de 1 cycle de la courbe. Le nombre de cycle et le niveau de fluorescence (quantité d'ADN amplifié) est représenté en abscisse et en ordonnée respectivement. (B) La dérivation de la courbe donne une droite ayant en ordonnée le Ct de chaque courbe d'amplification et en abscisse le Log_{10} de la concentration C_0 utilisée pour les amplifications.

3.2.3.2 Protocole pour la transcription inverse et les courbes de dilutions

L'amplification PCR a été réalisée suivant le protocole du guide de SYBR® Green RT-PCR (Applied Biosystem). Les expériences de PCR en temps réel ont été réalisées avec 100 ng d'ARN total rétro transcrit (Section 3.2.2), 12.5 µL de SYBR Mix (Invitrogen), 1.5 pmoles d'un mélange 50:50 d'amorces sens et anti-sens dans un volume final de 25 µL.

Tableau 3.2 : Composition du milieu réactionnel utilisé pour le qRT-PCR. Dans ce tableau, la quantité d'ADNc est représentative de la quantité d'ARN utilisée lors de la RT pour synthétiser l'ADNc. P5' représente l'amorce sens tandis que P3' représente l'amorce anti-sens.

Composant	Quantité pour un échantillon
ADNc 10 ng. µL ⁻¹	10 µL
SYBR MIX 2X	12.5 µL
P5' 10 µM	0.75 µL
P3' 10 µM	0.75 µL
H ₂ O	1 µL

Des amorces spécifiques d'ARN ribosomique 18S ont été utilisées comme contrôle endogène et les amorces pour les gènes ciblés ont été dessinées à l'aide d'outils bio-informatiques (voir Tableau 3.3 et section 3.3.2.2 Dessin des amorces). La PCR quantitative a été réalisée avec le *Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG with ROX* (Cat no. 11744-500; Invitrogen, Canada) et en utilisant l'appareil *ABI PRISM® 7000 Sequence Detection System* pour la mesure et le logiciel *ABI PRISM® 7000 Sequence Detection System software* pour la quantification. Pour chaque paire d'amorces, une dilution en série est effectuée pour déterminer leur efficacité. Les niveaux d'expression relatifs des transcrits sont calculés et normalisés par comparaison à l'abondance des ARN ribosomiques 18S. Chaque

réaction est effectuée en quadruplicata et la spécificité du produit de l'amplification est vérifiée par courbe de dissociation.

3.3 Analyses bio-informatiques et statistiques

3.3.1 Test ANOVA

Toutes les données générées par la mesure de la croissance des racines d'*Arabidopsis* et les données obtenues par la puce à ADN ont été analysées par la méthode statistique ANOVA (Fisher, 1954). Ces analyses ont permis de déterminer, entre 2 conditions (conditions d'exposition ou variété), les gènes dont le niveau d'expression est significativement différent (dans le cas de la puce à ADN) et les différences de sensibilités à l'Al chez les différentes lignées d'*Arabidopsis*. Cette méthode statistique a également été utilisée pour déterminer les différences significatives dans les test de qRT-PCR. Cette analyse a été réalisée avec le logiciel Graph Instat3 à partir des données normalisées.

3.3.2 Bio-informatique

3.3.2.1 BLAST et alignement de séquences

Le Basic Local alignment search Tool (BLAST) (Altschul *et al.*, 1990) a permis l'identification de séquences homologues chez le blé à celles déjà identifiées et parfois caractérisées chez d'autres espèces. Dans cette étude on a utilisé deux types de BLAST : le BLASTn qui permet d'identifier des séquences d'ADN homologues à d'autre séquences d'ADN et le tBASTn qui utilise des séquences protéiques connues pour identifier les séquences d'ADN dont la traduction en séquence protéique est homologue. Ces BLAST ont été réalisés dans les bases de données «Expressed sequence Tag» (EST) dans NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) et TIGR (<http://tigblast.tigr.org/tgi/>) Les alignements de séquences

protéiques et nucléiques (obtenues par les BLAST), ont été réalisés par le logiciel MultiAlin (Corpet, 1988) (<http://bioinfo.genopole-toulouse.prd.fr/multalin/multalin.html>).

3.3.2.2 Dessin des amorces

Les amorces ont été dessinées en utilisant les logiciels Primer3 (Rozen et Skaletsky, 2000) (http://waddellab3.life.smu.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) et PCR en temps réel Primer Design (<https://www.genscript.com/ssl-bin/app/primer>) (GenScript®) disponible gratuitement sur Internet en respectant les critères spécifiques des amorces pour l'utilisation du PCR en temps réel.

La spécificité et la taille des séquences amplifiées ont été vérifiées sur gel d'agarose. L'efficacité des amorces a ensuite été déterminée afin de valider les amorces. Les amorces ont été définies en imposant les critères suivants (Tableau 3.3) :

- température de dissociation $60^{\circ}\text{C} \pm 3$;
- longueur de l'amorce de $20 \text{ b} \pm 4$;
- taille de l'amplicon de 65 à 200 pb ;
- pourcentage de GC inférieur à 65 %.

Tableau 3.3 Liste des amorces utilisées avec leurs séquences et le nom des gènes ciblés pour le qRT-PCR.

Chaque paire d'amorces dessinée est associée au gène ciblé, à l'annotation utilisée dans ce projet et à ces séquences nucléotidiques.

Annotation	Nom du gène ciblé	Nom des amorces	Séquences 5'-3'
18S	18S	18S.F3	ATGCCTAGTAAGCGCGAGTCA T
		18S.R3	ACGGGCGGTGTGTACAAAG
Oxo	Oxalate oxydase	Oxo_86RL_64FU Oxo_86RL	TTTCTCCTCGCCGTGCTTCT GAGGGCTAGGATCATAGGCA GTG
ACS	ACC Synthase	ACCs_547RL_455FU ACCs_547RL	GGTGGAAGGCCAGGTTTGA CGAATCCTGGGTAGTAAGGC GTG
ACO	ACC Oxydase	ACCo_816RL_778FU ACCo_816RL	GCCTGTAGTCGTCGTCGAGGT AAACTGGGAGAGCACCTTCTT CGTG
GEN1	EFE Dioxygénase	GEN1.L GEN1.R GEN1.A.L GEN1.A.R	CTGGTGCATAGGGTTGTGAC CGTGCAGGTCTCTTGTGATC CAGACCTGGTGGATGACAAG TGTCCCTGTGGCATAAGTGT
GEN2	EFE Dioxygénase	GEN2.L GEN2.R GEN2.A.L GEN2.A.R	AGCTCGAGGGCAAGAAGAC CAATCCTGTACACAAACGCA GTACAGCCGGCACTACGTC TGGCGGTCTAGTTGATCTTG
GEN3	EFE Dioxygénase	GEN3.L GEN3.R GEN3.A.L GEN3.A.R	ACCAACGGCAGGTACAAGA GACTAGCTCCGGCAGTGG GCGGATGAACTTCTACCCA TCTTGTACCTGCCGTTGGT
EREBP	EREBP	EREBP.L EREBP.R	CTTTGGCGACGATGACTGT GCGAGATCATCAACAAGGTG
SAM	SAM Décarboxylase	SAM.L SAM.R SAM.A.L SAM.A.R	TCATCGTTCCTGCCAAATAA AGCATTGGCGACAGACATAA GAGATGGTGTCTGCTATGG TTATTGGCAGGAACGATGA
GEN6	ARF	GEN6.L GEN6.R	TGGTTTAGCATCAAGGCTGT ATAACCCTCACGGCAAATGT
GEN8	GH3	GEN8.L GEN8.R	GGGTCTGGCTAGGTCCATTA AGCGCTTATTCTAGCAGGGA
ABC	ABC	ABC.L ABC.R ABC.A.L ABC.A.R	CATCGGGAATCTCAATCTCA TGGTTGATGACATGCCATATT TCCTAGTTCCTAGACGGTGAA GT TGAGATTGAGATTCCCGATG

3.3.3 Puce à ADN et analyse des données

L'hybridation de la puce à ADN a été réalisée par le Centre d'Innovation de Génome Québec. Les GeneChip® Expression Arrays de blé (Affymetrix) ont tous été hybridés dans une seule expérience permettant ainsi l'analyse d'un signal résultant de la moyenne des mesures obtenues par les 11-20 paires d'oligonucléotides représentant chaque gène sur la puce à ADN. L'analyse de l'ensemble des résultats des puces à ADN a été effectuée après normalisation des signaux selon la technique *Robust Multi-Array* (RMA) développée par Irizzary *et al.* (2003). Le logiciel qui a permis ces ajustements a été fourni par le Centre d'Innovation de Génome Québec. Une différence d'expression de deux fois entre deux conditions a été utilisée pour identifier les gènes différentiellement exprimés. Une base de données des séquences utilisées pour le dessin de la puce à ADN a également permis d'identifier les profils d'expression de certains gènes de blé homologues de gènes d'intérêt connus chez *Arabidopsis*.

4. RÉSULTATS ET DISCUSSION

4.1 Étude de l'expression des gènes impliqués dans la synthèse de l'éthylène

Il a été démontré que l'Al bloque le transport de l'auxine, résultant dans son accumulation dans les pointes de racines (Hasenstein et Evans, 1988; Kollmeier *et al.*, 2000). Basé sur ces résultats, nous avons émis l'hypothèse que l'accumulation d'auxine pourrait activer l'expression de plusieurs gènes. Par exemple, l'ACC synthase (*Acs*), un des gènes majeurs impliqués dans la synthèse de l'éthylène a montré une induction après l'application d'auxine exogène sur des pointes de racines d'*Arabidopsis* (Abel et Theologis, 1996). L'implication de l'éthylène dans l'induction de la mort cellulaire (He *et al.*, 1996) et les interrelations entre l'auxine et l'éthylène ont permis de suggérer un lien possible avec l'induction de la mort cellulaire par l'Al dans les pointes de racines de cultivars sensible et tolérant de blé (Delisle *et al.*, 2001). Il apparaît donc intéressant de déterminer s'il y a une induction de la synthèse d'éthylène dans les pointes de racines de blé exposées à l'Al. Il est par contre impossible de mesurer directement la production d'éthylène dans les pointes de racines de la plante utilisée à cause de la nature volatile de cette hormone et de la possibilité de production de l'éthylène par plusieurs autres parties de la plante. C'est pourquoi on a établi le profil d'expression des gènes impliqués dans la synthèse de l'éthylène dans les pointes de racines chez un cultivar sensible et un cultivar tolérant par qRT-PCR.

Dans un premier temps, il a fallu identifier un nouveau cultivar de blé sensible à l'Al pour des raisons de renouvellement de variété. Ensuite on a établi une procédure de dessin d'amorces PCR pour un gène contrôle positif en réponse à l'Al (*Oxo*) et pour les gènes *Acs* et *Aco* impliqués dans la synthèse de l'éthylène. Enfin, on a établi le profil d'expression des *Acs* et *Aco* en utilisant des ARN extraits des pointes de racines de cultivar de blé sensible et tolérant exposés à l'Al. Les amorces pour un gène contrôle de réponse à l'Al ont été utilisées pour vérifier l'impact au niveau moléculaire de l'Al et améliorer la standardisation des expériences pour le qRT-PCR. Chaque série de pointes de racines a été extraite en triplicat

après avoir contrôlé l'ICR (50 %) des cultivars sensibles et tolérants pour des expositions à 5 μM et 50 μM d'Al respectivement pour des temps d'expositions de 6 h et 24 h.

4.1.1 Choix d'un nouveau cultivar sensible

Par le passé des profils d'expression ont été identifiés pour des gènes induits par l'Al dans les pointes de racines de cultivars de blé sensibles (Century et Fundy) et tolérant (Atlas66) à l'Al (Delisle *et al.*, 2001; Maltais et Houde, 2002). Ces expériences ont été basées en contrôlant l'effet de l'Al sur la différence de croissance des racines exposées à l'Al entre les cultivars sensibles et tolérants. Cependant les cultivars disponibles commercialement varient selon les besoins du marché et nous devons régulièrement sélectionner de nouveaux cultivars sensibles à l'Al. Avant d'avoir écoulé entièrement les grains du cultivar Fundy, nous avons donc examiné 6 nouveaux cultivars en utilisant les cultivars Atlas66 et Fundy comme référence (Tableau 4.1).

Le cultivar Fundy a montré une grande variabilité dans les tests d'ICR ainsi qu'un très faible taux de germination car les grains disponibles atteignaient leurs dates de péremption. Le cultivar Bounty a montré une ICR de 55 % et 80 % après l'exposition à 5 et 50 μM d'Al, respectivement. Les cultivars Fundulea et Maxine ont montré une plus faible sensibilité avec une ICR à 35 % et 40 % après exposition à 5 μM d'Al et une ICR de 75 et 74 % après exposition à 50 μM d'Al, respectivement. Les cultivars Platinum et Quantum ont montré une sensibilité intermédiaire (entre sensible et tolérant) avec une ICR entre 29 et 26 % pour une exposition à 5 μM et une ICR de 55 % pour une exposition à 50 μM d'Al. Enfin le cultivar Clair a montré des ICR similaires à celles du cultivar tolérant Atlas66 aux expositions à 5 et 50 μM (Tableau 4.1).

Tableau 4.1 : Inhibition de croissance de nouveaux cultivars de plantes. Les cultivars Atlas66, Bounty, Fundy, Clair, Fundulea, Maxine, Platinum et Quantum sont présentés avec le pourcentage d'inhibition de croissance pour des expositions à 5 μM et 50 μM d'Al (n=30).

Nom du cultivar	%ICR à 5 μM d'Al	%ICR à 50 μM d'Al
Atlas66	7 \pm 12	57 \pm 11
Bounty	55 \pm 4	80 \pm 15
Fundy	50 \pm 20	68 \pm 28
Clair	13 \pm 12	56 \pm 5
Fundulea	35 \pm 15	75 \pm 14
Maxine	40 \pm 12	74 \pm 11
Platinum	29 \pm 14	57 \pm 13
Quantum	26 \pm 14	57 \pm 16

Nous avons donc sélectionné Bounty car il a la même sensibilité dans les test d'ICR que les autres cultivars sensibles (Delisle *et al.*, 2001; Hamel *et al.*, 1998; Maltais et Houde, 2002). Le cultivar Clair a été caractérisé comme un cultivar tolérant à l'Al et pourra être utilisé à l'avenir pour confirmer des résultats obtenus avec notre cultivar tolérant contrôle Atlas66. Dans toutes les expériences qui suivent, les pointes de blé sont extraites de plantules exposés dont l'ICR 50 % a été validé à 5 μM pour le cultivar Bounty et à 50 μM pour le cultivar Atlas66.

4.1.2 Validation de la réponse moléculaire d'un gène de stress à l'Al pour le PCR en temps réel

Le gène de l'oxalate oxydase (*Oxo*) a été identifié comme un gène de stress répondant à l'Al grâce à la technique de northern (GenBank AF005084; Hamel *et al.*, 1998). Ce gène a

été choisi comme contrôle de toxicité de l'Al au niveau moléculaire car les résultats montrant son induction dans les pointes de racines exposées à l'Al ont démontré une grande reproductibilité. On a donc choisi de dessiner les amorces pour le gène *Oxo* pour le qRT-PCR afin de confirmer l'effet de l'Al sur les séries d'échantillons de pointes de racines extraites. Cependant, les résultats de Hamel *et al.* (1998), obtenus par analyse northern, doivent être adaptés aux spécificités du qRT-PCR. En effet le northern fonctionne par hybridation de séquence à partir de 80 % d'homologie là où le qRT-PCR fonctionne avec une grande spécificité envers la séquence ciblée (Gachon *et al.*, 2004). C'est pourquoi nous avons dessiné des amorces dans une zone conservée entre les séquences possédant une forte homologies avec *Oxo*. On a donc effectué un BLASTn dans la base de donnée TIGR pour obtenir plusieurs contigs présentant de fortes homologies de séquence avec *Oxo*. L'alignement des séquences a permis de déterminer les polymorphismes dans les séquences d'ADN (Fig. 4.1).

Figure 4.1

```

1                                     50
TC250527
TC250529
TC250530 TTTGCCATTA GGGTGGCAAA TTTTGGAGGG GGATTGGGCG GGCCTTTTGT
TC250531
TC250528
OXO
OXO.R
OXO.F
Consensus

51                                     100
TC250527
TC250529
TC250530 ATTAACCCAC CCTGCGAAAG GGAATGTCT TCAGCCGATT AATTTGGTAA
TC250531
TC250528
OXO
OXO.R
OXO.F
Consensus

101                                    150
TC250527
TC250529                                     AT TTAGGTGACC
TC250530 CGCCAGGTTT TTCCATTCAC GACGTTTGAA ACGCGGGCCA GTGAATGTTA
TC250531
TC250528
OXO
OXO.R
OXO.F
Consensus

151                                    200
TC250527
TC250529 TCCACAACAA GTTGTA AAAA AAGAGTTCCC ACCGGTC-CG GAATTCCC GG
TC250530 TTCGACTCAC TTTAGGGCGA ATGGGG-CCG ACGTGGA-TG CTCCGGCCGC
TC250531                                     A ACGTGGCATG CTCCGGCCGC
TC250528
OXO
OXO.R
OXO.F
Consensus . . . . .

```

```

201
TC250527          CCACGC GTCCGCA-CA ATGGCCTCCT CTCCCTCCTT
TC250529 GATATCGTCG ACCCAGCGT -----CCGCA ATGGCTTCCT CTTCCTCATT
TC250530 CATGGCGCCG GATTAAGCGT GGTCGCGGCC GAGTCTTCTC TTTCCTCATT
TC250531 CATGCCGCCG GATT----GT GGTCGCGGCC AGGTCTTC-- ----CTCATT
TC250528
  OXO
  OXO.R
  OXO.F
Consensus .....

```

```

251
TC250527 GTTTCTCCTC GCCGTGCTTC TTGCGCTGGT CTCATGGCAG GCCACTGCCT
TC250529 GTTTCTCCTT GCAGCCCTTC TTGCGCTGGC CTCATGGCAG GCCACTGCCT
TC250530 GTTTCTCCTT GCAGCCCTTC TTGCGCTGGC CTCATGGCAG GCCACTGCCT
TC250531 GTTTCTCCTC GCCGTGCTTC TTGCCCTGGC CTCATGGCAG GTCACTGCCT
TC250528
  OXO
  OXO.R
  OXO.F
Consensus .tttctctc gccgtgcttc t..... . cactgcct

```

```

301
TC250527 ATGATCCTAG CCCTCTGCAA GACTTCTGCG TCGCCGACAT GAAGTCACCT
TC250529 ATGATCCTAG CCCTCTCAG GACTTCTGCA TTGCCGACAT GAAGGCGCCT
TC250530 ATGATCCTAG CCCTCTCAG GACTTCTGCA TTGCCGACAT GAAGGCGCCT
TC250531 ACGATCCTAG CCCTCTCAA GACTTCTGCA TCGCCGACAT GAAGGCGCCT
TC250528          TCTGCAA GACTTCTGCG TCGCCGACAT GAAGTCACCT
  OXO
  OXO.R
  OXO.F
Consensus atgatcctag ccctct.ca. gacttctgc. t.gccgacat gaag.c.cct

```

```

351
TC250527 GTGCGAGTAA ATGGATTTCC TTGCAAGGAC CCAATGGCCG TCAACCCGGA
TC250529 GTGCGAGTAA ATGGATTTGC TTGCAAGGAC CCAATGGCCG CAACCCGGA
TC250530 GTGCGAGTAA ATGGATTTGC TTGCAAGGAC CCAATGGCCG CAACCCGGA
TC250531 GTGCGAGTAA ATGGATTTGC TTGCAAGGAC CCAATGGCCG CAACCCGGA
TC250528 GTGCGAGTAA ATGGATTTCC TTGCAAGGAC CCAATGGCCG TCAACCCGGA
  OXO
  OXO.R
  OXO.F
Consensus gtgcgagt.a atggattt.c ttgcaaggac ccaatggccg ..a.cccgga

```

401 450
 TC250527 AGATTTCTTC AATCCAGCCA TGCTTGACCA ACCTAGGGAT ACTAAGAACA
 TC250529 AGACTTCTTC AACGCAGCCA TGCTCGATCA GCCTAGGGAT ACTAAGGCCA
 TC250530 AGACTTCTTC AACGCAGCCA TGCTCGATCA GCCTAGGGAT ACTAAGGCCA
 TC250531 AGACTTCTTC AACGCAGCCA TGCTCGATCA GCCTAGGGAT ACTAAGGCCA
 TC250528 AGATTTCTTC AATCTAGCCA TGCTTGACAA ACCTAGGGAT ACTAAGAACA
 OXO AGATTTCTTC AATCCAGCCA TGCTTGACCA ACCTAGGGAT ACTAAGAACA
 OXO.R
 OXO.F
 Consensus aga.ttcttc aa...agcca tgct.ga..a .cctagggat actaag...a
 451 500
 TC250527 GCAAGGTTGG GTCCAACGTC ACCAACATTA ACGTCATCAA CTTTCCTGGC
 TC250529 GCAAGGTCAG GTCTAACGTC ACCAACATCA ATGTCATAAA TTTCCCTGGC
 TC250530 GCAAGGTCAG GTCTAACGTC ACCAACATCA ATGTTATAAA TTTCCCGGGC
 TC250531 GCAAGGTCAG GTCTAACGTC ACCAACATCA ATGTCATAAA TTTCCCGGGC
 TC250528 GCAAGGTTGG GTCCAACGTC ACCAACATTA ACGTCATCAA TTTTCCTGGC
 OXO GCAAGGTTGG GTCCAACGTC ACCAACATTA ACGTCATCAA CTTTCCTGGC
 OXO.R
 OXO.F
 Consensus gcaaggt..g gtc.aacgtc accaacat.a a.gt.at.aa .tt.cc.ggc

 501 550
 TC250527 CTCAACACCC TTGGTATCTC GCTGGCACGC ATCGACTATG GACCATTGGG
 TC250529 CTCAACACCC TCGGCATCTC GCTGGCTCGC ATCGACTATG GACCATTAGG
 TC250530 CTCAACACCC TCGGCATCTC GTTGGCACGC ATCGACTATG GACCATTAGG
 TC250531 CTCAACACCC TCGGCATCTC GCTGGCTCGC ATCGACTATG GACCGTTAGG
 TC250528 CTCAACACCC TTGGCATCTC GCTGGCACGC ATCGACTATG GACCATTGGG
 OXO CTCAACACCC TTGGTATCTC GCTGGCACGC ATCGACTATG GACCATTGGG
 OXO.R
 OXO.F
 Consensus ctcaacaccc t.gg.atctc g.tggc.cgc atcgactatg gacc.tt.gg

 551 600
 TC250527 CGTGAACACC CCGCATATAC ATCCCCGTGC CACTGAGCTC CTTACTGTGC
 TC250529 TGTGAACACG CCACACATAC ACCCCCGTGC CACTGAGCTC CTCACAGTGC
 TC250530 TGTGAACACG CCACACATAC ACCCTCGTGC CACTGAGCTC CTCACGGTGC
 TC250531 TGTGAACACG CCACACATAC ACCCTCGTGC CACTGAGCTC CTCACAGTGC
 TC250528 CGTGAACACA CCACATATAC ATCCCCGTGC CACTGAGCTC CTTACTGTGC
 OXO CGTGAACACC CCGCATATAC ATCCCCGTGC CACTGAGCTC CTTACTGTGC
 OXO.R
 OXO.F
 Consensus .gtgaacac. cc.ca.atac a.cc.cgtgc cactgagctc ct.ac.gtgc

	601				650
TC250527	TTGAGGGAAC	TCTCTACCTT	GGATTTGTCA	CATCCAACCC	AAATAGGCTC
TC250529	TTGAGGGGAC	ACTCTACCTT	GGATTTGTCA	CATCCAACCC	AAACAGGCTC
TC250530	TCGAGGGGAC	ACTCTACCTT	GGATTTGTCA	CATCCAACCC	AAACAGGCTC
TC250531	TCGAGGGGAC	ACTCTACCTT	GGATTTGTCA	CATCCAACCC	AAACAGGCTC
TC250528	TTGAGGGAAC	TCTCTACCTT	GGATTTGTCA	CATCCAACCC	AAATAGGCTC
OXO	TTGAGGGAAC	TCTCTACCTT	GGATTTGTCA	CATCCAACCC	AAATAGGCTC
OXO.R					
OXO.F					
Consensus	t.gaggg.ac	.ctctacctt	ggatTTgtca	catccaaccc	aaa.aggctc
	651				700
TC250527	TTCTCCAGGG	TGGTCAAGAA	GGGTGACGTA	TTTGTGTTCC	CGAAGGCAAT
TC250529	TTCTCAAAGA	TAGTTAAGAA	GGGCGATGTA	TTCGTATTCC	CAAAAGCAAT
TC250530	TTCTCAAAGA	TAGTTAAGAA	GGGTGATGTA	TTCGTATTCC	CAAAAGCAAT
TC250531	TTCTCAAAGA	TAGTTAAGAA	GGGCGATGTA	TTCGTATTCC	CAAAAGCAAT
TC250528	TTCTCCAGGG	TGGTCAAGAA	AGGTGACGTA	TTTGTGTTCC	CGAAGGCAAT
OXO	TTCTCCAGGG	TGGTCAAGAA	GGGTGACGTA	TTTGTGTTCC	CGAAGGCAAT
OXO.R					
OXO.F					
Consensus	ttctc.a.g.	t.gt.aagaa	.gg.ga.gta	tt.gt.ttcc	c.aa.gcaat
	701				750
TC250527	GATCCACTTC	CAAATGAATC	TAGCGCATGA	CAAGCCAGCA	GCTGCGTTGT
TC250529	GATCCACTTC	CAAATGAACC	TAGCGCATGA	CAAGCCAGCA	GCCGCGTTGT
TC250530	GATCCACTTC	CAAATGAACC	TAGCGCATGA	CAAGCCAGCA	GCCGCGTTGT
TC250531	GATCCACTTC	CAAATGAACC	TAGCGCATGA	CAAGCCAGCA	GCCGCGTTGT
TC250528	GATCCACTTC	CAAATGAATC	TAGCACATGA	CAAGCCAGCA	GCTGCGTTGT
OXO	GATCCACTTC	CAAATGAATC	TAGCGCATGA	CAAGCCAGCA	GCTGCGTTGT
OXO.R					
OXO.F					
Consensus	gatccacttc	caaatgaa.c	tagc.catga	caagccagca	gc.gcgttgt
	751				800
TC250527	CGTCACTCAG	CAGCCAAAAC	CCAGGAGTTA	TTTCTATTGC	CAATGCAGTC
TC250529	CCTCGCTCAG	CAGCCAAAAC	CCTGGAGTTA	TTTCTATTGC	CAATGCAGTA
TC250530	CCTCGCTCAG	CAGCCAAAAC	CCTGGAGTTA	TTTCTATTGC	CAATGCAGTG
TC250531	CCTCGCTCAG	CAGCCAAAAC	CCTGGAGTTA	TTTCTATTGC	CAATGCAGTG
TC250528	CATCACTCAG	CAGCCAAAAC	CCAGGAGTTA	TTTCTATTGC	CAATGCAGTC
OXO	CGTCACTCAG	CAGCCAAAAC	CCAGGAGTTA	TTTCTATTGC	CAATGCAGTC
OXO.R					
OXO.F					
Consensus	c.tc.ctcag	cagccaaaac	cc.ggagtta	tttctattgc	caatgcagt.

```

801
TC250527 TTTGGATCAA ACCCACCAT TTCGGATGAT GTTTTGGCCA CGGCGTTTCA
TC250529 TTTGGATCAA AGCCACCGAT TTCGGATGAT GTCTTAGCCA CGGCATTTCA
TC250530 TTTGGATCAA AGCCACCGAT TTCGGATGAT GTCTTAGCCA CGGCATTTCA
TC250531 TTTGGATCAA AGCCACCGAT TTCGGATGAT GTCTTAGCCA CGGCATTTCA
TC250528 TTTGGATCAA ACCCACCAT TTCGGATGAT GTTTTGGCCA CGGCGTTTCA
OXO TTTGGATCAA ACCCACCAT TTCGGATGAT GTTTTGGCCA CGGCGTTTCA
OXO.R
OXO.F
Consensus tttggatcaa a.ccacc.at ttcggatgat gt.tt.gcca cggc.tttca

851
TC250527 GGTGGAAAAG AACTGATTG ATTGGCTCCA ATCTCAGTTC TGGGAGAATA
TC250529 GGTGGAGAAG GATCTCATT ACTGGCTCCA ATCTCAGTTC TGGGGGAACA
TC250530 GGTGGAGAAG GATCTGATT ACTGGCTTCA ATCTCAGTTC TGGGGGAACA
TC250531 GGTGGAGAAG GATCTCATT ACTGGCTCCA ATCTCAGTTC TGGGGGAACA
TC250528 GGTGGAAAAG AACTGATTG ATTGGCTCCA ATCTCAGTTC TGGGAGAATA
OXO GGTGGAAAAG AACTGATTG ATTGGCTCCA ATCTCAGTTC TGGGAGAATA
OXO.R
OXO.F
Consensus ggtgga.aag .a.ct.att. a.tggct.ca atctcagttc tggg.gaa.a

901
TC250527 ACCACTACTA A-TATGTTGT AGTGTTTACA CCTATAAATA GTATAAA---
TC250529 CCAACTACTA AATATTCTCT TTTATCTGGG CATATGGGAA GTTAATATGT
TC250530 CCAACTACTA AATATTCTCT TTTATCTGGG CATATGGGAA GTTAATATGT
TC250531 CCAACTACTA AATATTCTCT TTTATCTGGG CATATGAGAA GTTAATATGT
TC250528 ACCACTACTA A-TATGTTGT AGTGTTTACA CCTATAAATA GTATAAA---
OXO ACCACTACTA A
OXO.R
OXO.F
Consensus .c.actacta a.....

951
TC250527 -----GAA TAAATGA---
TC250529 AATGATATAT A-----GAA TAAATGACAT GCAATACGTA
TC250530 AATGATATAT A-----GAA TAAATGACAT GCAATACGTA
TC250531 AATGATATAT ACTCCCATCA TGGAGTAGAA TAAATGACAT GCAATATG-A
TC250528 -----GAA TAAATGTCAT G-----
OXO
OXO.R
OXO.F
Consensus .....

```

```

1001
TC250527 -----TC ATTTTCCTTT- TGAATCGTGA
TC250529 TGCATGCATG GTTGCAGCT GTGAATTTTT ATTTTCCTTT TGAATCGTGA
TC250530 TGCATGCATG GTTGCAGCT GTGAATTTTC ATTTTCCTTT TGAATCGTGA
TC250531 TGCATGCATG GTTGCAGCT GTGAATTTTC ATTTTCCTTT TGAATCGTGA
TC250528 TATGTGTGTG CCTGCGAGCC GCGAGTTTTT CATTTCCTTT TGAATCGTGA
OXO
OXO.R
OXO.F
Consensus .....

1051
TC250527 CAATATATGT TGTTTGTGG ATTGATATAG TAATATGGTG ACAGTGTAAG
TC250529 CAAGATATGT TTTTGTGTCAG ATTCATGTCA TAATGTGCTG GTGATGTTT-
TC250530 CAAGATATGT TTTTGTGTCGG ATTCATGTCA TAATGTGCTG GTGATGTTT-
TC250531 CAAGATATGT TTTTGTGTCGG ATCAAAAACC T-----CGG GCGATGTTT-
TC250528 CAATATATGT TGTTTGTGG ATTGATATAG TAATATGGTG ACAGTGTAAG
OXO
OXO.R
OXO.F
Consensus .....

1101
TC250527 CATTTGGTTG TTTAATAAAT GGAATACA-T GGTGTCTCTT CCTCGTTNNA
TC250529 ---TCA-CTG TTTGATGAAT GGAATACAGA GGTGCTCCTT TCTCCAAGTC
TC250530 TTTTCA-CTG TTTAATGAAT GGAATACAGA GGTGCTCCTT TCTCCCATTG
TC250531 ---TCA-CGG TTAAGGAT GGGATACANA GG-GCCCCTT C
TC250528 CATTTGGTTG TTTAATAAAT GGAATACCGG GGTGTCTCTT TCCCTCGTAA
OXO
OXO.R
OXO.F
Consensus .....

1151
TC250527 ANAAA-----GAGAN AAACNCCAGG GGGGCC-----C
TC250529 CCCGGGCGGC CGCTCGAATC CGCGCCCATG GCGGCCGGAA CATCCAAGTC
TC250530 CT-----GATAT AGAGGTCATG GTGTAATGAG AAAGCA--TC
TC250531
TC250528 CTGAA-----ATAAG AGAATCGATG AAGTT-----C
OXO
OXO.R
OXO.F
Consensus .....

```

```

1201
TC250527 TNTACCAATT CCCCTAAATN AGTCCTTTTAC CC
TC250529 GGGCCAAATC GCCCTATATG AGTCGTATAC AATCATGGCC GTCGTTTTAA
TC250530 ATGATTGG-C ACGC-ATGTC ATTC-TAGAC A--CAGTTCC TTTGAAAANN
TC250531
TC250528 ATGAGAAAAA A
OXO
OXO.R
OXO.F
Consensus .....

1251
TC250527
TC250529 ACGTCGGGA
TC250530 NNNNNGGA
TC250531
TC250528
OXO
OXO.R
OXO.F
Consensus

```

Figure 4.1 Alignement des séquences d'acides nucléiques de l'oxalate l'oxydase et d'autres séquences d'acides nucléiques homologues pour le dessin d'amorces destinées au qRT-PCR. Cet alignement présente le gène de l'oxalate oxydase (*Oxo*) (GenBank AF005084), les amorces dessinées pour le qRT-PCR (*Oxo_86RL* et *Oxo_86RL_64FU* (Tableau 3.3) sont annotées OXO.R et OXO.F respectivement sur la figure) et les contigs homologues au gène *Oxo* (TC250527, TC250529, TC250530, TC250531 et TC250528) ont été identifiés sur la base de donnée TIGR avec un BLASTn. Toutes les séquences sont alignées en fonction de leur homologie, et les zones fortement conservées sont indiquées en bleu. Les zones de dessin des amorces ont été encadrées sur cet alignement.

Les amorces ont été dessinées, en suivant les restrictions pour le PCR en temps réel, dans les zones de fortes homologies présentant le minimum de polymorphismes (Fig. 4.1). On voit sur la Figure 4.1 que les amorces présentent 4 polymorphismes dans la séquence Oxo_86RL_64FU et aucun dans la séquence Oxo_86RL. L'alignement présente une grande surface de zone conservée (indiquée en bleu sur la Fig. 4.1). Cependant les restrictions imposées pour le dessin des amorces en qRT-PCR n'ont pas permis de choisir une paire d'amorce dans ces régions. De plus, l'amorce Oxo_86RL_64FU est identique à la séquence de 3 des 5 gènes identifiés dont la séquence *Oxo* originalement clonée en réponse à l'Al (Hamel *et al.*, 1998). Pour déterminer la spécificité des amorces, on a effectué la courbe de dissociation avec des quantité d'ADNc théorique allant de 10ng jusqu'à 160ng par réaction. La droite dérivée de la courbe de dissociation a permis de calculer l'efficacité des amorces à 98 % (Fig. 4.2 et Tableau 4.2). Ces amorces ont montré une grande spécificité (Fig. 4.3).

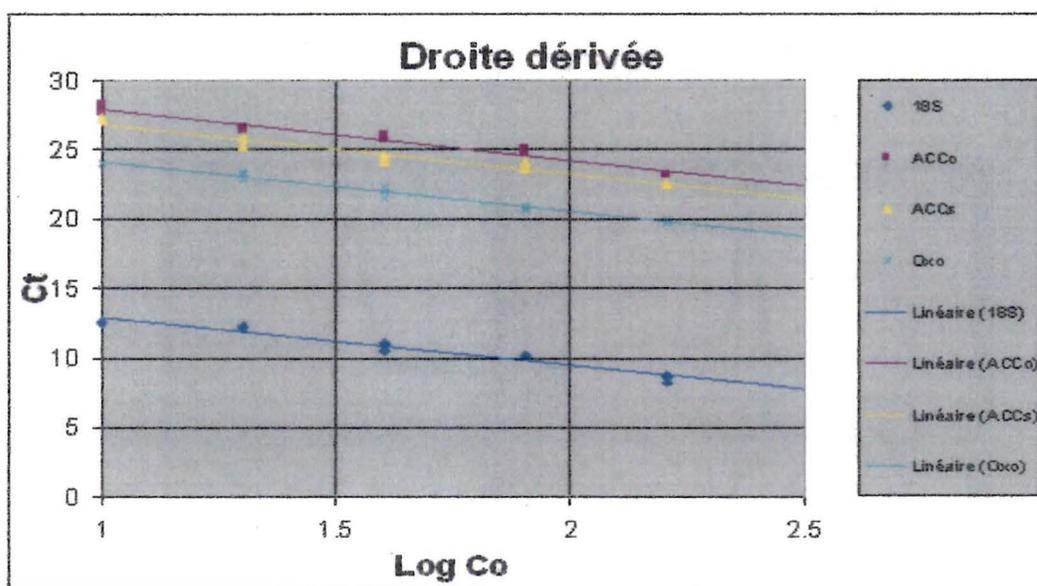


Figure 4.2 Droite d'efficacité des amorces des gènes *18S*, *Oxo*, *Acs* et *Aco*, utilisées en qRT-PCR.

Les amorces 18S.R3/18.F3, Oxo_86RL_64FU/Oxo_86RL, ACCo_816RL_778FU/ ACCo_816RL, ACCs_547RL_455FU/ ACCs_547RL ont été utilisées pour *18S*, *Oxo*, *Acs* et *Aco* respectivement. Les droites sont tracées en fonction du Ct par rapport au log de Co. Ct représente le cycle « cycle Threshold ». Co représente la quantité d'ADNc utilisée pour chaque réaction en ng. Les équations des droites et le R_2 ont été rapportés dans le tableau 4.2. , respectivement 18S.R3/18.F3, Oxo_86RL_64TU/ Oxo_86RL, ACCo_816RL_778FU/ ACCo_816RL, ACCs_547RL_455FU/ ACCs_547RL.

Tableau 4.2 : Mesure de l'efficacité des amorces pour le qRT-PCR.

Les amorces ont été testées et validées pour les gènes *18S*, *Oxo*, *Aco*, *Acs*, *GEN1*, *GEN2*, *GEN3*, *SAMd* et *ABC*. Les amorces pour ces gènes sont associées à la droite d'efficacité (équation de la droite et corrélation R^2) et à leur efficacité calculée en pourcentage.

Nom du gène potentiel	Paire d'amorces	Équation	R^2	Efficacité (%)
18S	18S.F3/18S.R3	$y = -3,4164x + 16,334$	0,9492	99
Oxo	Oxo_86RL_64TU/ Oxo_86RL	$y = -3,5611x + 27,685$	0,9806	88.5
Aco	ACCo_816RL_778FU/ ACCo_816RL	$y = -3,65x + 31,548$	0,9704	89.4
Acs	ACCs_547RL_455FU/ ACCs_547RL	$y = -3,6117x + 30,49$	0,9464	92.9
GEN1	GEN1.A.L /GEN1.A.R	$y = -3,3437x + 30,041$	0,9492	99,1
GEN2	GEN2.A.L/ GEN2.A.R	$y = -3,333x + 30,813$	0,9684	99,5
GEN3	GEN3.A.L/ GEN3.A.R	$y = -3,5507x + 38,265$	0,9767	91.3
SAMd	SAM.L/ SAM.R	$y = -3,2823x + 30,139$	0,9672	101.7
SAMd	SAM.A.L/ SAM.A.R	$y = -3,3272x + 34,034$	0,9768	99,8
ABC	ABC.A.L/ ABC.A.R	$y = -3,4747x + 34,273$	0,9729	94

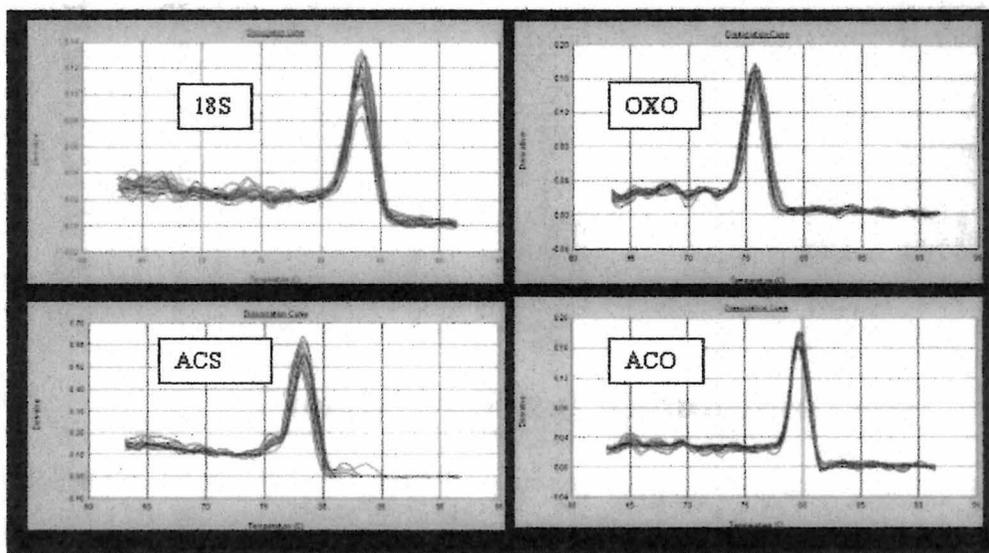


Figure 4.3 : Courbes de dissociations pour les amorces 18S, OXO, ACS et ACO. Les courbes représentent une dénaturation libérant des molécules SYBR Green dans les fragments amplifiés et fait chuter la fluorescence. La spécificité d'une paire d'amorces est caractérisée par un pic unique. La superposition de tous les répliquats utilisé pour les différentes concentrations.

Les tests ont révélé un facteur d'induction proche de 5 pour des expositions de 5 et 50 μM d'Al pour Bounty et Atlas66 respectivement, de même qu'un facteur 25 pour Bounty exposé à 50 μM d'Al (Fig. 4.4). Ces résultats reflètent parfaitement le profil d'expression identifié par les expériences réalisées en utilisant les analyses northern (Hamel *et al.*, 1998). Ils ont également montré une induction visible et reproductible à des concentrations d'Al conférant une ICR 50 % pour les deux types de cultivars.

Pour l'analyse de l'expression des gènes impliqués dans la synthèse de l'éthylène (*Acs* et *Aco*) l'ARN a été extrait des pointes de racines de cultivars sensibles et tolérants de blé exposés à 0, 5 et 50 μM d'Al pendant 6 heures et 24 heures. Les échantillons ont été utilisés pour effectuer les tests de qRT-PCR sur les amorces des gènes de synthèse de l'éthylène.

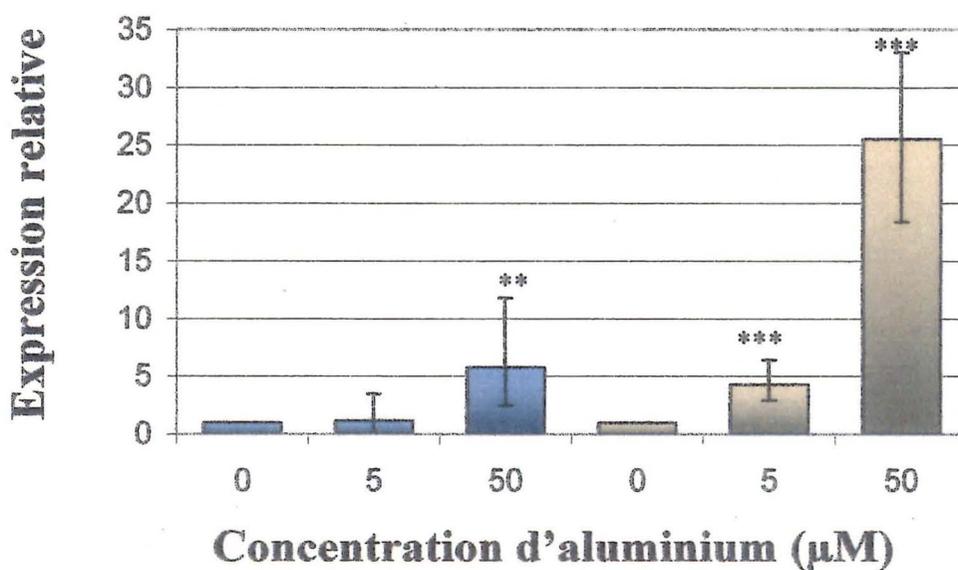


Figure 4.4 : Niveau d'expression de l'oxalate oxydase servant de gène contrôle de réponse à l'Al pour les cultivars Atlas66 et Bounty.

Les résultats pour les cultivars Atlas66 et Bounty sont représentés par les histogrammes bleus et orange respectivement. Ces résultats sont exprimés en unité relative au point Atlas66 0 μM qui représente un niveau relatif ajusté à 1. Ils sont tirés des analyses faites par qRT-PCR avec les amorces Oxo_86RL_64FU/Oxo_86RL. Les expériences ont été réalisées en triplicat (***) $P < 0.001$; ** $P < 0.01$; * $P > 0.05$).

4.1.3 Profil d'expression des gènes impliqués dans la synthèse de l'éthylène

Le gène *TaACS2* exprimé dans les pointes de racines de blé est un gène identifié et séquencé (Subramaniam *et al.*, 1996; GenBank. U35778). Les amorces à dessiner sur ce gène doivent donc être spécifiques à cette séquence. Comme précédemment, on a effectué un BLASTn pour trouver les copies de gènes et un alignement de séquences pour trouver les polymorphismes (Fig. 4.5). La séquence *TaACS2* est incluse dans la séquence TC254283 qui représentent un contig. Ces deux séquences sont parfaitement identiques entre elles et différentes de la 3eme séquence OV.111L07F. On a donc utilisé les différences entre les séquences *TaACS2* et TC254283 avec la séquence OV.111L07F pour dessiner des amorces plus spécifiques aux gènes *Acs* dans les racines de blé. Les 2 amorces ACCs547RL et ACCs547RL_455FU ont été dessinées sur un segment possédant 3 et 9 polymorphismes respectivement, mais elles sont parfaitement identiques aux segments sur les séquences *TaACS2* et TC254283. Comme précédemment, la spécificité des amorces a été validée par courbe de dissociation (Fig. 4.3). La droite dérivée a permis de calculer l'efficacité à 92 % pour une quantité allant de 20ng jusqu'à 100ng d'ADNc (Fig. 4.2 et Tableau 4.2).

La séquence du gène *Aco* chez le blé n'étant pas connue, on a du procéder différemment pour le choix des amorces. On s'est basé sur les séquences protéiques connues chez *Arabidopsis* (GenBank Q06588) et chez le riz (GenBank X85747). On a effectué un tBLASTn pour trouver les séquences d'ESTs traduites homologues à ces séquences protéiques. En alignant ces séquences on constate une forte homologie de séquences entre les ESTs traduits de blé et les séquences protéiques de ACO chez *Arabidopsis* et le riz (Fig. 4.6). En alignant les séquences d'ESTs avec la séquence d'acides nucléiques des gènes *Aco* chez le blé, nous avons pu déterminer les polymorphismes et les zones d'homologies pour dessiner les amorces (Fig. 4.7). Les difficultés d'amplification rencontrées pour les précédentes paires d'amorces nous ont amené à dessiner les amorces dans une région plus conservée où la validité de la séquence serait plus sûre. Les séquences d'EST TC234945 et TC234937 ont montré une plus grande similarité entre elles plutôt qu'avec TC234939. On a choisi en

fonction des restrictions du qRT-PCR et de l'homologie de séquences de dessiner les amorces dans une zone de forte homologie entre TC234945 et TC234937. Les amorces ACCo_816_RL_FU et ACCo_816_RL, sont parfaitement accordées avec les séquences TC234945 et TC234937, et possèdent 2 et 3 polymorphismes respectivement vis-à-vis de TC234939 (Fig. 4.8). La courbe de dissociation a permis de valider la spécificité des amorces (Fig. 4.2). La droite dérivée a permis de calculer l'efficacité à 89.4 % pour des concentrations de 20ng jusqu'à 100ng d'ADNc (Fig. 4.2 et Tableau 4.2).

Figure 4.5

```

1                                     50
TaACS2
TC254283      CTCAAGC TCAAGAAGCT TCACCAATCT CCCTTTCAAG CCCACGAACC
OV.111L07F   CTTCACTCCT CTAATTCTCT TCTCTAAGCT GCCTGCTCT- -CCTAGCTCA
TC256337
ACS.R
ACS.F
Consensus    .....

51                                     100
TaACS2
TC254283      TTCATCAGCT AGATT-AGCG CAGAACA-TT CT-TGGCCTC TCTTCTTGTC
OV.111L07F   GTCTTGAACA CACTCGATCA CAGCTCACTT CTGTGCGCTC -CAGCGAGCC
TC256337
ACS.R
ACS.F
Consensus    .....

101                                    150
TaACS2
TC254283      TGTCCTGTGTT TCACCTCATC CATCGATCTT TAGCTAGCTG ACCCTCATAG
OV.111L07F   ---CCCAGTT TCAAACCCAG CCAAACACGC GCGC-AGCAT TCCTTGACTG
TC256337
ACS.R
ACS.F
Consensus    .....

151                                    200
TaACS2
TC254283      ACCCGAGAGC GCAGATGGCA AGCAGATCCG CCG-AGCTTC TCTCGAGGAT
OV.111L07F   ACGAGATGGT GAACAAGG-T CGCCGACGAG CCGCAGCTGC TGTCCAAGAA
TC256337
ACS.R
ACS.F
Consensus    .....

201                                    250
TaACS2
TC254283      GGCCGCCGGC GACGGCCACG GCGAGAACTC GTCCTACTTC GACGGGTGGA
OV.111L07F   GGCCGGATGC AACACCCACG GCCAGGACTC GTCCTACTTC CTGGGATGGG
TC256337
ACS.R
ACS.F
Consensus    .....

```

	251				300
<i>TaACS2</i>					
TC254283	AGGCGTACGA	CATGAACCCC	TCCACCCGC	AGGACAACCG	CGGGGGCGTC
OV.111L07F	AGGAGTATGA	GAAGAACCCC	TTCGACGCCA	TCACCAACCC	CAGCGGCATC
TC256337					
ACS.R					
ACS.F					
Consensus
	301				350
<i>TaACS2</i>					
TC254283	ATCCAGATGG	GCCTCGCCGA	GAACCAACTC	TCGCTGGACC	TGATCGAGGA
OV.111L07F	ATCCAGATGG	GCCTCGCCGA	GAACCAGCTG	TCGTTCGACC	TGGTGGAGGA
TC256337					
ACS.R					
ACS.F					
Consensus
	351				400
<i>TaACS2</i>				CCAT	TTGCACGGCG
TC254283	GTGGAGCAAG	GCCCACCCGG	AGGCGTCCAT	TTGCACGGCG	GAGGGCCCC-
OV.111L07F	GTGGCTGGAG	AAGAACCCCG	ACGCGCTCGG	CCTC-CGCCG	GGGAGCCGCG
TC256337					
ACS.R					
ACS.F					
Consensus
	401				450
<i>TaACS2</i>	TCGCAGTTCA	AGAGGATCGC	CAATTTCCAG	GACTACCACG	GCCTCCCGGA
TC254283	TCGCAGTTCA	AGAGGATCGC	CAATTTCCAG	GACTACCACG	GCCTCCCGGA
OV.111L07F	TCCGTCTTCC	GCGAGCTCGC	GCTCTTCCAG	GACTACCACG	GCCTCCCGGC
TC256337					
ACS.R					
ACS.F					
Consensus
	451				500
<i>TaACS2</i>	GTTTCAGACAG	GCGATGGCCC	AGTTCATGGG	GCAGGTGAGG	GGTGGAAAGG
TC254283	GTTTCAGACAG	GCGATGGCCC	AGTTCATGGG	GCAGGTGAGG	GGTGGAAAGG
OV.111L07F	CTTCAAAAAT	GCATTGGCGA	GGTTCATGTC	AGAGCAGAGA	GACTACAAGG
TC256337					
ACS.R					
ACS.F					
Consensus	GGTGGAAAGG ...t..aagg

```

501
TaACS2 CCAGGTTTGA CCCGGATCGC GTCGTGATGA GCGGGGGCGC CACCGGGCGCG 550
TC254283 CCAGGTTTGA CCCGGATCGC GTCGTGATGA GCGGGGGCGC CACCGGGCGCG
OV.111L07F TGGCGTTCGA CCCAGCAAC ATCGTGCTCA CCGCCGGCGC CACCTCGGCC
TC256337
ACS.R
ACS.F CCAGGTTTGA
Consensus ....gtt.ga .....

```

```

551
TaACS2 CAGGAGACGC TCGCCTTCTG CCTTGCCAAC CCCGGCGAGG CCTTCCTCGT 600
TC254283 CAGGAGACGC TCGCCTTCTG CCTTGCCAAC CCCGGCGAGG CCTTCCTCGT
OV.111L07F AACGAGGCGC TCATGTTCTG CCTCGCCGAC CAGGGCGACG CATTCTCAT
TC256337
ACS.R
ACS.F
Consensus .....

```

```

601
TaACS2 GCCCACGCCT TACTACCCAG GATTCCGACCG CGACTGCTGC TGGAGGTCAG 650
TC254283 GCCCACGCCT TACTACCCAG GATTCCGACCG CGACTGCTGC TGGAGGTCAG
OV.111L07F CCCACCCCG TACTACCCAG GGTTCGACCG TGACCTCAAG TGGCGCACCG
TC256337
ACS.R
ACS.F
Consensus ...cac.cc. tactaccag g.ttcg.....

```

```

651
TaACS2 GAGTGAAGCT GCTGCCGATC GAGTGCCACA GCTCCAACGA CTTCAGGATC 700
TC254283 GAGTGAAGCT GCTGCCGATC GAGTGCCACA GCTCCAACGA CTTCAGGATC
OV.111L07F GGGCCGAGAT CGTACCGGTG CACTGCACCA GCGCCAACGG CTTCGGGTG
TC256337
ACS.R
ACS.F
Consensus .....

```

```

701
TaACS2 ACCAGGGAGG CCGTCGTGGC CGCGTACGAG AGCGCGACGA GCAACGGCGT 750
TC254283 ACCAGGGAGG CCGTCGTGGC CGCGTACGAG AGCGCGACGA GCAACGGCGT
OV.111L07F ACGCGCTCCG CCNTGGACGA CGC
TC256337
ACS.R
ACS.F
Consensus .....

```

```

751                                     800
TaACS2 CCGCGTCAAG GGGATCCTCA TCACCAACCC GTCCAACCCG CTGGGCACGA
TC254283 CCGCGTCAAG GGCATCCTCA TCACCAACCC GTCCAACCCG CTGGGCACGA
OV.111L07F
TC256337
ACS.R
ACS.F
Consensus .....

801                                     850
TaACS2 CGGCGGACCG GGCACGCTG GCCATGCTCG CCACCTTCGC CACGGAGCAC
TC254283 CCGCGGACCG GGCACGCTG GCCATGCTCG CCACCTTCGC CACGGAGCAC
OV.111L07F
TC256337 TG CGACCCACGC TTCCGA---C
ACS.R
ACS.F
Consensus .....

851                                     900
TaACS2 CGCGTGCACC TCATCTGCGA CGAGATCTAC GCGGGGTCGG TCTTCGCCAA
TC254283 CGCGTGCACC TCATCTGCGA CGAGATCTAC GCGGGGTCGG TCTTCGCCAA
OV.111L07F
TC256337 CAGATNCATN CCACATTCCG C---TTCTGT GCAA---CGG ACGAGGCTAA
ACS.R
ACS.F
Consensus .....

901                                     950
TaACS2 GCCGGAGTAC GTGAGCATCG CCGAGGTGAT CGAGCGCGAC GCCCCCGGCC
TC254283 GCCGGAGTAC GTGAGCATCG CCGAGGTGAT CGAGCACGAC GCCCCCGGCC
OV.111L07F
TC256337 -CCAGCAACA GCGAGC---G ATGAGGCCAT C---CACCAT GGCTCGAGCC
ACS.R
ACS.F
Consensus .....

951                                     1000
TaACS2 CCGACCGGGA CCTCATCCAC ATCGCCTACA GCCTCTCAA GGATTTGGC
TC254283 CCGACCGGGA CCTCATCCAC ATCGCCTACA GCCTCTCAA GGACTTCGGC
OV.111L07F
TC256337 CT---CGCGG CCGCGGCT-- ---GCCGTCC TCGCCGCCGT GGTCTGCG--
ACS.R
ACS.F
Consensus .....

```

```

1001                                     1050
TaACS2 CTCCCAGGGGT TCCGCGTCGG CATCGACTAC TCGTACAACG ACGCCGTCGT
TC254283 CTCCCAGGGGT TCCGCGTCGG CATCGTCTAC TCGTACAACG ACGCCGTCGT
OV.111L07F
TC256337 ---CCGG--- --CGCGACCC CGGAGACGAC GTGCAGGGCG GCGGCG--GG
ACS.R
ACS.F
Consensus .....

1051                                     1100
TaACS2 GGCCTGCGCG CGCAAGATGT CCAGCTTCGG CTTCGT
TC254283 GGCCTGCGCG CGCAAGATGT CCAGCTTCGG CCTCGTGTCC TCGCAGACGC
OV.111L07F
TC256337 CGCCGACAGG CGCGTGGACT ACCGCTTCTG C---GTGTCC AGGCTGAGCC
ACS.R
ACS.F
Consensus .....

1101                                     1150
TaACS2
TC254283 AGCTCTTC-C TGGCCAAGAT GCTCGGGGAC GAGGAGTTCA TGGCCCGGTT
OV.111L07F
TC256337 AGCACCACGA CAGCCCCGAC GCC--GACAC GTGGGG--CC TGGCCAAG--
ACS.R
ACS.F
Consensus .....

1151                                     1200
TaACS2
TC254283 CCTGCGCGAG AGCGCGCGGC GGCTGGCGGC GCGGCACGAG CTGTTACAGT
OV.111L07F
TC256337 -----GT GGCCGCCGAC GTGG-GCGTG CT-----
ACS.R
ACS.F
Consensus .. .....

1201                                     1250
TaACS2
TC254283 CGGGGCTCCG CGAGGTCGGC ATCGGGTGCC TGGGCGGCAA CGCCGGGCTC
OV.111L07F
TC256337 ----- CATGGCCAGC AACGGCGTCT ACGACATCAA GGCCATGCTC
ACS.R
ACS.F
Consensus .....

```

```

1251                                     1300
  TaACS2
TC254283 TTCTCGTGGA TGGACCTGCG GGGCATGCTC CGGGAGAAGA CGGCGGAGGC
OV.111L07F
TC256337 GCCGGCAAGG AGGAGCGGCC GG-CGGGCGC CAGGGC---- --GCGCGGGC
  ACS.R
  ACS.F
Consensus .....

1301                                     1350
  TaACS2
TC254283 GGAGCTGGAG CTGTGGCGGG TCATCATCCG CAAGGTGAAG CTCAACGTGT
OV.111L07F
TC256337 --CGCTGGAG CAGTG-CGAG GCGCTGTACG ACAGGATGGG CGCCGCGT-T
  ACS.R
  ACS.F
Consensus .....

1351                                     1400
  TaACS2
TC254283 CGCCGGGGAC GTCGTTCCAC TGCGGCGAGC CCGGGTGGTT CCGCGTCTGC
OV.111L07F
TC256337 CGCCGAGG-- --CGTACGAC GGCATCGA-C AGGCGCGACT ACGCGGCGGG
  ACS.R
  ACS.F
Consensus .....

1401                                     1450
  TaACS2
TC254283 CACGCCAACA TGGACGACGA GACCATGGGG GTGGCGCTGA GCCGGATCCG
OV.111L07F
TC256337 CAAG--GAGA AGGCCGGCGA GGCCGCGTCC CTCGCGCGCC GCTGCGCCCA
  ACS.R
  ACS.F
Consensus ....

1451                                     1500
  TaACS2
TC254283 GGACTTCGTG CGCCAGCACC AGCAGCAGAA GGCCAAGGCC CAGCGCTGGG
OV.111L07F
TC256337 GCCTTCG-- --CCC GCGCC GCGTCCG TGCC--GCC ACG-GCTGGC
  ACS.R
  ACS.F
Consensus .....

```

```

1501                                     1550
  TaACS2
TC254283 CCGCCAGGGG CCACCTCCAC CTCAGCCTGC AGCGCCACGG CGCCATGGCT
OV.111L07F
TC256337 CAAGCAGGG- ----CGCCGA CTCGG--TGC AGATGGCCAT CGTCTGCACC
  ACS.R
  ACS.F
Consensus .....

1551                                     1600
  TaACS2
TC254283 TCGCAGTACC ACGCGC-TCT CCAGCCCCAT GGCCGCGCTG CTGTCCCCC
OV.111L07F
TC256337 GC-CATTACC AACCTCGTCA AGTGAATGAT CTCTGCATTG TTTGCCCGTC
  ACS.R
  ACS.F
Consensus ..

1601                                     1650
  TaACS2
TC254283 AGTCTCCGCT GGTCCATGCC -GCCAGCTAA GTCGGTCGCC ACGGTCGGTC
OV.111L07F
TC256337 -GAGAGAAAT GGGCCGTGTC TGCATTGTTG ATTGCTCGAC -CGTGATGTC
  ACS.R
  ACS.F
Consensus .....

1651                                     1700
  TaACS2
TC254283 AAGTGAGCCG CACGTACATT TGGTACGTAC ACACTTTTTT CGATCGCATG
OV.111L07F
TC256337 ATGTACGCC- ----TGTGTT TG----- ----TGATAT CGATCG-TTG
  ACS.R
  ACS.F
Consensus .....

1701                                     1750
  TaACS2
TC254283 CATGCATGGC ACGGTGCACG CATGGGGCCA GGGTGCATGC GATTGTTTTG
OV.111L07F
TC256337 ATAGTG-GAC TTGGTG---G TAGTGGTACG ACGTTCTTC- -ACTGTTGTG
  ACS.R
  ACS.F
Consensus .....

```

```

                                1751                                1800
    TaACS2
    TC254283 GAAGGTTTAG ACATGCGAAA TGCAGCATGT AGTAGCGTAA CGTTTTACGG
    OV.111L07F
    TC256337 TCGGTGTCAG AAG---GGAA TAAACATTGC ATTATCTTT- --TTCAAAAA
    ACS.R
    ACS.F
    Consensus .....

                                1801                                1850
    TaACS2
    TC254283 AGGTTGCAAT GGCGCCGAT GTGGGCAAGC CGTGTGTGAC CACGCATGGT
    OV.111L07F
    TC256337 AAAAAAAGG GCGGCCGCT CTAGAGTATC CCT---CGAG GCGCCAAGC
    ACS.R
    ACS.F
    Consensus .....

                                1851                                1900
    TaACS2
    TC254283 ATTACCATCA TCTTAGTTTT GTTTATGGTT TGGATTGGTC TGATCGGATC
    OV.111L07F
    TC256337 CTTACGCGTA CCCAGCTTTT ----CTGGTC CAAGTTG
    ACS.R
    ACS.F
    Consensus .....

                                1901                                1950
    TaACS2
    TC254283 AAGGCTTCTC GATCAGATCC TGTAATAAAC TCGTACCGAG GTACAAGATT
    OV.111L07F
    TC256337
    ACS.R
    ACS.F
    Consensus

```

Figure 4.5 Alignement des séquences d'acides nucléiques de *TaACS2* et d'autres séquences d'acides nucléiques homologues pour le dessin d'amorces destinées au qRT-PCR pour *TaACS2*.

Cet alignement présente le gène *TaACS2* (GenBank. U35778), les amorces dessinées pour le qRT-PCR (ACCs547RL et ACCs547RL_455FU annotées ACS.R et ACS.F respectivement sur la figure) et les contigs homologues au gène *TaACS2* identifiés sur la base de donnée TIGR avec un BLASTn (TC254283, OV.111L07F et TC256337). Toutes les séquences sont alignées en fonction de leur homologie, et les zones fortement conservées sont indiquées en bleu. Les zones de dessin des amorces ont été encadrées sur cet alignement.

Figure 4.6

	1					50
AtAC01						MESFPINLE
OsACO					MAP	TSTFPVINME
TC234945	HASAWLL	RTSSGKLSSV	GKKKHPETQP	VSNQEGKMAS		TLSPFIIDMG
TC234939			K HTHHTHTHT	QMALPANAAA		SLSFPVIHME
TC234937	TRPHMHSKRL	QRSHRAARDR	FQHQAPQAAE	QVR-ELEM	MAP	ASSFPFIIDMG
Consensus	ma.	..sFP!In\$e
	51					100
AtAC01	KLNGEERAIT	MEKIKDACEN	WGFFECVNHG	ISLELLDKVE		KMTKEHYKCC
OsACO	LLAGEERPAA	MEQLDDACEN	WGFFEILNHG	ISTELMDEVE		KMTKDHYKRV
TC234945	LLRGDERPAA	MNLLHDACEN	WGFFQVLDHG	ISTELMDEVE		KMTKEHYKRV
TC234939	KLETGERGAT	MGVIRDACEN	WGFFELLNHG	ISAEMLDEVE		RVSKAHYAAC
TC234937	LLAGEERPAA	MDLLHDACEN	WGFFQVLDHG	ISTELMDEVE		KMTKEHYKRV
Consensus	lL.geERpaa	Me.l.DACEN	WGFF#.l#HG	lStEL\$DeVE		kmtKeHYkrv
	101					150
AtAC01	MEERFKESIK	NRGLDS--LR	SEVNDVDWES	TFYKHLPPVS		NISDVPDLDD
OsACO	REQRFLEFAS	KTLEKGCDDV	NKAEKLDWES	TFVVRHLPES		NIADIPDLDD
TC234945	REQRFLEFAS	KTLEDG-GKA	--AENLDWES	TFVVRHLPEP		NIAEIPDLDD
TC234939	REEQKFEFAA	KTLEAG-EKG	DDVKDWDWES	TFVVRHLPAS		NLADLPDLDD
TC234937	REQRFLEFAS	KTLEDG---G	RAAENLDWES	TFVVRHLPEP		NIAEIPDLDD
Consensus	rE#rFLEfas	ktl.dg....	..ae.lDWES	TF %vrHLPes		Nia#iPDLDD
	151					200
AtAC01	DYRTLKDFFA	GKIEKLSEEL	LDLLCENLGL	EKGYLKVFY		GSKR-PTFGT
OsACO	DYRRLMKRFA	AELTLAERL	LDLLCENLGL	EKGYLTKAFR		GPAGAPTFGT
TC234945	DYRRVMKQFA	SELERLAERL	LDLLCENLGL	EKGYLTRAFR		GSKGAPTFGT
TC234939	HYRQVMKEFA	AEIEKLAEKV	LDLLCENLGL	EQGYLKRAFA		GSRG-PTFGT
TC234937	DYRRVMKQFA	AELERLAERL	LDLLCENLGL	EKGYLTRAFR		GSKGVPTFGT
Consensus	dYRrlMK.FA	aeLE.LaErl	LDLLCENLGL	EkGYLtkafR		Gskg.PTFGT
	201					250
AtAC01	KVSNYPCCPN	PDLVKGLRAH	TDAGGIILLF	QDDKVSGLQL		LKDGEWVDVP
OsACO	KVSSYPCCPR	PDLVKGLRAH	TDRGGIILLF	QDDSVGGLQL		LKDGEWVDVP
TC234945	KVSSYPCCPR	PDLVKGLRAH	TDAGGIILLF	QDDRVGGLQL		LRDGEWVDVP
TC234939	KVSSYPCCPR	PDLVAGLRAH	TDAGGVILLF	QDDQVSGQLQL		LKDGAWVDVP
TC234937	KVSSYPCCPR	PDLVKGLRAH	TDAGGIILLF	QDDCVGGLQL		LKDGEWVDVP
Consensus	KVSSYPCCPr	PDLvkGLRAH	TDaGG!ILLF	QDD.VgGLQL		LkdGEwVDVP
	251					300
AtAC01	PVKHSIVVNL	GDQLEVITNG	KYKSVEHRVL	SQT-DGEGRM		SIASFYNPGS
OsACO	PMRHSIVVNL	GDQLEVITNG	RYKSMHRVV	AQ--TDGNRM		SIASFYNPGS
TC234945	PTRHSIVVNL	GDQLEVITNG	RYKSVLHRVV	AQ--ADGNRM		SIASFYNPAS
TC234939	PMRHAIIVNI	GDQLEVITNG	RYKSMHRVL	TR--PDGNRM		SLASFYNPGA
TC234937	PTRHSIVVNL	GDQLEVITNG	RLQERAPTAW	SRRPTATGCP		SPPSTTRPGT
Consensus	P.rHsIVVnl	GDQLEVITNG	ryksv.hrv.	sq.....grm		SiaSfynPgs

```

301                                     350
AtAC01 DSVIFPAPEL IGK----EAE KEKKENYPRF VFEDYMKLYS AVKFOAKEPR
OsACO  DGVISPAPAL VK-----E EEAVVAYPKF VFEDYMKLYV RHKFEAKEPR
TC234945 DAVIFPAPAL VE-----AE AAGGA-YPRF VFEDYMKLYV RHKFEDKEPR
TC234939 DAVIFPAPAL VEELSEEEAE RAGSAVYPRF VFEDYMNLYL LHKFEAKEPR
TC234937 RS-FSPAPAL AE----- -AAGGASPGS --GPRIHEAV RAPQVRQGPQ
Consensus dsvifPAPaL .....ae .e....yPrf vfedymklyv r.kf.akePr

351                                     400
AtAC01 FEAMKAMETT VANNVGPLAT A
OsACO  FEAFKSMETE TSNRIAIA
TC234945 FEAFKSMDSH SSNLIATANQ QLRTTPLLCS PNVASVNGGR WHIGCSRVTCT
TC234939 FQAMKADAAP IATALGTWSY VPESRTRVFW DVLKWCIVDN L---CMRVCF
TC234937 VQAFKSMESQ TTRLFAPVGN KTTGSVALSP IVASLCRGNN H-----
Consensus f#AfKsmet. ..n..ap... ..

401                                     450
AtAC01
OsACO
TC234945 --YVRTKPLA AVWCRINEPA GLCATPSEDM EECLSFSLCC AASDQHESECT
TC234939 RWWLRSAPVH AVMLVLPYVV NFF-----L YVCVMYSLRP KLTKSE
TC234937 -MELENPPLI GV
Consensus .....

451
AtAC01
OsACO
TC234945 VLC
TC234939
TC234937
Consensus ...

```

Figure 4.6 : Alignement des séquences protéique de AtACO1, OsACO et d'autres séquences protéiques pour la recherche de séquences ACO chez le blé.

Cet alignement présente les protéines AtACO1(GenBank. NP179549), OsACO (GenBank. U35778) et les séquences protéiques homologues au gène *OsACO* identifiées sur la base de donnée TIGR avec un tBLASTn (TC234945, TC234939 et TC234937). Toutes les séquences sont alignées en fonction de leur homologie, les zones fortement conservées sont indiquées en bleu et les zones de conservation parfaite sont indiquées en rouge.

Figure 4.7

```

1                                     50
OsACO
TC234945 CCACGCGTCC GCCTGGCTCC TTCGTACATC ATCAGGCAAG CTCTGAAGCT
TC234937 CCACGCGTCC GCATATGCAC AGCAAGCGCT TGCAGAGAAG CCATAGAGCT
TC234939
ACO.F
ACO.R
Consensus .....

51                                     100
OsACO
TC234945 -CGGTAGGCA AGAAGAAACA TCCGGAGACG CAGCCTGTCT CGAA---TCA
TC234937 GCCCGAGATC GGTTCAGCA CCAGGCGCCG CAGGCCGAG AACAAGTTCG
TC234939   ACAAACA CACACATACA CACACACACA CA-CACACAC AGATGGCACT
ACO.F
ACO.R
Consensus .....

101                                    150
OsACO
TC234945 ATGGCACCGA CTTCGACGTT CCCGGTCATC AACATGGAGT
TC234945 AGAGGGTAAG ATGGCATCGA CATTGTCATT CCCCATCATC GACATGGGTC
TC234937 AGAGCTAGAA ATGGCGCCGG CTTCGTCTT CCCGATCATC GACATGGGGC
TC234939 TCCTGCTAAT GCCGCTGCCT CGTTGAGCTT CCCGGTGATC CACATGGAGA
ACO.F
ACO.R
Consensus .....

151                                    200
OsACO
TC234945 TGCTCGCCGG GGAGGAGCGA CCTGCGGCGA TGGAGCAGCT GGATGATGCT
TC234945 TGCTCCGCGG GGACGAGCGG CCGGCGGCGA TGAACCTTCT GCACGATGCA
TC234937 TGCTGGCCGG GGAGGAGCGA CCCGCGGCCA TGGACCTGCT GCATGACGCA
TC234939 AGCTTGAGAC CGGGAAAGG GCGCGACCA TGGGGGTCAT CCGCGATGCC
ACO.F
ACO.R
Consensus .....

201                                    250
OsACO
TC234945 TGCGAGAACT GGGGATTCTT CGAGATCCTG AACCACGGCA TCTC GCCTGT
TC234945 TGCGAGAACT GGGGCTTCTT CCAGGTCCTG GACCACGGCA TCTC GCCTGT
TC234937 TGCGAGAACT GGGGATTCTT CCAGGTCCTG GACCACGGCA TCTC GCCTGT
TC234939 TGCGAGAACT GGGGATTCTT CGAGCTGCTG AACCATGGCA TCTC GGCCGT
ACO.F
ACO.R
Consensus .....gcctgt

```

```

                251                               300
OsACO   AGTCGTCGTC GAGGTGGAGA AGATGACCAA GGACCACTAC AAGCGTGTGC
TC234945 AGTCGTCGTC GAGGTGGAGA ACACGAAGAA GGTGCTCTCC CAGTTTGTGC
TC234937 AGTCGTCGTC GAGGTGGAGA ACACGAAGAA GGTGCTCTCC CAGTTTGTGC
TC234939 AGTCGTCGTC GAGGTGGAGC GGTGAGCAA GGCGCACTAC GCGGCTTGCC
ACO.F   AGTCGTCGTC GAGGT
ACO.R   CACGAAGAA GGTGCTCTCC CAGTTT
Consensus agtcgtcgtc gaggt..... ..a.ga..aa gg.gc.ct.c .ag..t....

```

```

                301                               350
OsACO   GCGAGCAGAG GTTCCTCGAG TTCGCGAGCA AGACGCTCAA GGAAGGCTGC
TC234945 GGGAGCAGAG GTTCCTCGAG TTCGCGAGCA AGACGCTGGA GGACGGCG-G
TC234937 GCGAGCAGAG GTTCCTCGAG TTCGCCAGCA AGACGCTGGA GGACGGCG-G
TC234939 GGGAGGAGCA GTTCAAGGAG TTCGCGGCGA AGACGCTGGA GGCCGGCGAG
ACO.F
ACO.R
Consensus .....

```

```

                351                               400
OsACO   GACGACGTGA ATAAGGCGGA GAAGCTGGAC TGGGAGAGCA CCTTCTTCGT
TC234945 CAAGGCG--- GCGG-----A GAACCTGGAC TGGGAGAGCA CCTTCTTCGT
TC234937 CAGGGCG--- GCGG-----A GAACCTGGAC TGGGAGAGCA CCTTCTTCGT
TC234939 AAGGGCG--- ACGACGTGAA GGACGTAGAC TGGGAGAGCA CCTTCTTCGT
ACO.F
ACO.R
Consensus .....

```

```

                401                               450
OsACO   CCGCCACCTC CCGGAGTCCA ACATCGCCGA CATACCCGAC CTCGACGACG
TC234945 GCGCCACCTC CCGGAGCCCA ACATCGCCGA GATACCCGAC CTCGACGACG
TC234937 GCGCCACCTC CCGGAGCCCA ACATCGCCGA GATACCCGAC CTCGACGACG
TC234939 CCGCCACCTT CCCGCCTCCA ACCTCGCCGA CCTGCCCGAC CTCGACCACC
ACO.F
ACO.R
Consensus .....

```

```

                451                               500
OsACO   ACTACAGGCG CCTCATGAAG CGCTTCGCGG CGGAGCTGGA GACGCTGGCG
TC234945 ACTACAGGCG GGTGATGAAG CAGTTCGCGT CGGAGCTGGA GAGGCTGGCG
TC234937 ACTACAGGCG GGTGATGAAG CAGTTCGCGG CGGAGCTGGA GAGGCTGGCG
TC234939 ACTACAGGCA AGTGATGAAG GAATTGCGG CGGAGATCGA GAAGCTGGCG
ACO.F
ACO.R
Consensus .....

```

	501				550
<i>OsACO</i>	GAGCGGCTAC	TGGACCTGCT	CTGCGAGAAC	CTCGGCCTCG	AGAAGGGCTA
TC234945	GAGCGGCTGC	TGGACCTGCT	CTGCGAGAAC	CTCGGCCTGG	AAAAGGGGTA
TC234937	GAGCGGCTGC	TGGACCTGCT	CTGCGAGAAC	CTCGGCCTCG	AGAAGGGGTA
TC234939	GAGAAGGTGC	TGGACCTGCT	GTGCGAGAAC	CTGGGCCTGG	AGCAGGGGTA
ACO.F					
ACO.R					
Consensus
	551				600
<i>OsACO</i>	CCTCACCAAG	GCCTTCCGTG	GCCCCGCGGG	CGCACCCACC	TTCGGCACCA
TC234945	CCTCACGCGC	GCGTTCCGTG	GCTCCAAGGG	CGCCCCCACC	TTCGGCACCA
TC234937	CCTCACGCGG	GCGTTCCGGG	GCTCCAAGGG	CGTCCCCACC	TTCGGCACCA
TC234939	CCTGAAGCGA	GCATTGCGCG	GTTCAAGGGG	C---CCGACG	TTCGGCACCA
ACO.F					
ACO.R					
Consensus
	601				650
<i>OsACO</i>	AGGTCAGCAG	CTACCCGCCG	TGCCCGCGCC	CCGACCTCGT	CGAGGGCCTC
TC234945	AGGTCAGCAG	CTACCCTCCC	TGCCCGCGCC	CGGACCTCGT	CAAGGGCCTC
TC234937	AGGTCAGCAG	CTACCCGCCG	TGCCCGCGCC	CGGACCTCGT	CAAGGGCCTC
TC234939	AGGTGAGCAG	CTACCCACCG	TGCCACGCGC	CCGACCTGGT	CGCCGGCCTC
ACO.F					
ACO.R					
Consensus
	651				700
<i>OsACO</i>	CGCGCCACACA	CCGACGCCGG	CGGCATCATC	CTGCTCTTCC	AGGACGACCG
TC234945	CGCGCCACACA	CCGACGCCGG	CGGCATCATC	CTGCTCTTCC	AGGACGACCG
TC234937	CGCGCGCACA	CCGACGCCGG	CGGCATCATC	CTGCTCTTCC	AGGACGACTG
TC234939	CGCGCGCACA	CCGACGCCGG	CGGCGTCATC	CTGCTGTTCC	AGGACGACCA
ACO.F					
ACO.R					
Consensus
	701				750
<i>OsACO</i>	CGTCGGTGCC	CTCCAGCTGC	TCAAGGACGG	CGAGTGGGTG	GACGTGCCGC
TC234945	CGTCGGCGGG	CTCCAGCTGC	TCAGGGACGG	CGAGTGGGTG	GACGTGCCGC
TC234937	CGTCGGCGGG	CTCCAGCTCC	TCAAGGACGG	CGAGTGGGTG	GACGTGCCGC
TC234939	GGTGAGCGGG	CTCCAGCTCC	TCAAGGATGG	AGCATGGGTG	GACGTGCCGC
ACO.F					
ACO.R					
Consensus

```

751                                     800
OsACO  CCATGCGCCA CTCCATCGTC GTCAACCTCG GCGACCAGCT GGAGGTGATC
TC234945 CCACGCGCCA CTCCATCGTC GTCAACCTGG GCGACCAGCT GGAGGTGATC
TC234937 CCACGCGCCA CTCCATCGTC GTCAACCTGG GCGACCAGCT GGAGGTGATC
TC234939 CCATGCGCCA CGCCATCGTC GTCAACATCG GCGACCAGCT GGAGGTGATC
ACO.F
ACO.R
Consensus .....

```

```

801                                     850
OsACO  ACCAACGGCA GGT-ACAAGA GCGTGATCC- ACCGGGTGGT GGCGCAGACC
TC234945 ACCAACGGCA GGT-ACAAGA GCGTGCTCC- ACCGCGTGGT CGCGCAGGCC
TC234937 ACCAACGGCA GGTACAAGA GCGTGCTCCC ACCGCGTGGT CCCGCAGGCC
TC234939 ACCAACGGGC GGT-ACAAGA GCGTGATGC- ACCGCGTGCT CACCCGCCCC
ACO.F
ACO.R
Consensus .....

```

```

851                                     900
OsACO  GACGGCAACA GGATGTCCAT CGCGTCGTTT TACAACCCTG GCAGCGACGC
TC234945 GACGGCAACC GGATGTCCAT CGCCTCCTTC TACAACCCGG CCAGCGACGC
TC234937 GACCGCAACC GGATGTCCAT CGCCTCCCTC TACAACCCGG CCAGGGACGC
TC234939 GACGGCAACC GCATGTCCCT CGCCTCCTTC TACAACCCCG GCGCGGACGC
ACO.F
ACO.R
Consensus .....

```

```

901                                     950
OsACO  CGTGATCTCC CCT-----G CGC-----C GCGCTGGTG AAGGAGGAGG
TC234945 GGTGATCTTC CC-----GG CGC-----C GCGCTGGTG GAGGCGGAGG
TC234937 GGTCAATTTT CC-----CGG CGC-----C GGCCCTGG-- ----CGGAGG
TC234939 CGTCATCTTC CCTGCCCCGG CGCTTGTCGA GGAGCTGTCT GAGGAGGAGG
ACO.F
ACO.R
Consensus .....

```

```

951                                     1000
OsACO  AGG-----C CGTCGTGGC- --GTACCCCA AGTTCGTGTT CGAGGACTAC
TC234945 CGG-----C CGGCGGGGC- --GTACCCCA GGTTCGTGTT CGAGGACTAC
TC234937 CGG-----C CGGCGGTGC- --GT-CCCCA GGTTCGGGTC CGAGGA-TAC
TC234939 CGGAGCGTGC CGGGAGCGCC GTGTACCCGA GGTTCGTGTT CGAGGACTAC
ACO.F
ACO.R
Consensus .....

```

	1001		1050
<i>OsACO</i>	ATGAAGCTGT	ACGTGCGCCA	CAAGTTCGAG
TC234945	ATGAAGCTGT	ACGTGCGCCA	CAAGTTCGAG
TC234937	ATGAAGCTGT	ACGTGCGCCA	CAAGTCCGAT
TC234939	ATGAACCTGT	ACTTGCTCCA	CAAGTTCGAG
ACO.F			
ACO.R			
Consensus
	1051		1100
<i>OsACO</i>	GGCGTTCAAG	TCCATGGAAA	CCGAGACCTC
TC234945	GGCCTTCAAG	TCCATGGACA	GCCACAGCTC
TC234937	G-CCTTCAAG	TCCATGGAGA	GCCAAACCAC
TC234939	GGCCATGAAG	GC---GGA--	-----CGC
ACO.F			
ACO.R			
Consensus
	1101		1150
<i>OsACO</i>	AG		
TC234945	AGAACCAACA	ACTACGTACT	ACGCCCTTGC
TC234937	GGAAACAA-A	ACCACGGGAT	CCG---TTGC
TC234939	G--ATTAGGG	ACGTGGTCGT	ACG----TGC
ACO.F			
ACO.R			
Consensus
	1151		1200
<i>OsACO</i>	TCGGTCAATG	GTTGAGGA-C	GATGGCACAT
TC234945	TCGGTCAATG	GTTGAGGA-C	GATGGCACAT
TC234937	TCGTTAT---	GTCGAGG--C	AATAAC-CAT
TC234939	ATTTTGGGAC	GTATTGAAGT	GGTGTATCGT
ACO.F			
ACO.R			
Consensus
	1201		1250
<i>OsACO</i>	CGTACGTACG	TACTAAAC-C	ACTAGCTGCT
TC234945	CGTACGTACG	TACTAAAC-C	ACTAGCTGCT
TC234937	AATCC-----	-----AC-C	GCTAATCGGT
TC234939	TATGCGTGTG	TAATGTTTTT	GCTGGTGGCT
ACO.F			
ACO.R			
Consensus

```

                                1251                                1300
OsACO
TC234945 GCCTGCTGGC TTGTGTGCTA CGCCTAGCTA GGAGGATATG TAGGAGGAGT
TC234937
TC234939 GCCGTGATGC TTGTTT--TA C-CGTACGTG TGAGTCAACT TCTTTTTATA
ACO.F
ACO.R
Consensus .....

                                1301                                1350
OsACO
TC234945 GTTTGTTCATT TTCGCTGTGT TGTGCTGCTT CCGACCAGCA TGAGAGCTGT
TC234937
TC234939 GTATGTGTGT TAAG---TAA TGTACTCCCT CCGTCCAAAA T-----TAA
ACO.F
ACO.R
Consensus .....

                                1351                                1363
OsACO
TC234945 ACTGTTCTGT GTC
TC234937
TC234939 CCAAGTCAGA GAC
ACO.F
ACO.R
Consensus .....

```

Figure 4.7 : Alignement des séquences d'acides nucléiques de *OsACO* et d'autres séquences d'acides nucléiques homologues pour le dessin d'amorces destinées au qRT-PCR d'un gène *Aco* de blé.

Cet alignement présente le gène *OsACO* (GenBank X85747), les amorces dessinées pour le qRT-PCR (ACCo_816_RL_778FU et ACCo_816_RL annoté ACO.F et ACO.R respectivement sur la figure) et les séquences d'acides nucléiques contigs provenant de l'alignement des séquences protéiques avec *OsACO* et *AtACO*. Toutes les séquences sont alignées en fonction de leur homologie, et les zones fortement conservées sont indiquées en bleu. Les zones de dessin des amorces ont été encadrées sur cet alignement.

Les profils d'expression obtenus avec les amorces pour amplifier le gène *Acs* n'ont pas montré de différences significatives à 6 ou 24 heures d'exposition à l'Al pour le cultivar sensible et tolérant. Cependant, on a observé une induction progressive de facteur 1.5 puis 2 pour une exposition à 5 μM et 50 μM d'Al respectivement, pendant 24 heures pour le cultivar Bounty (Fig. 4.8).

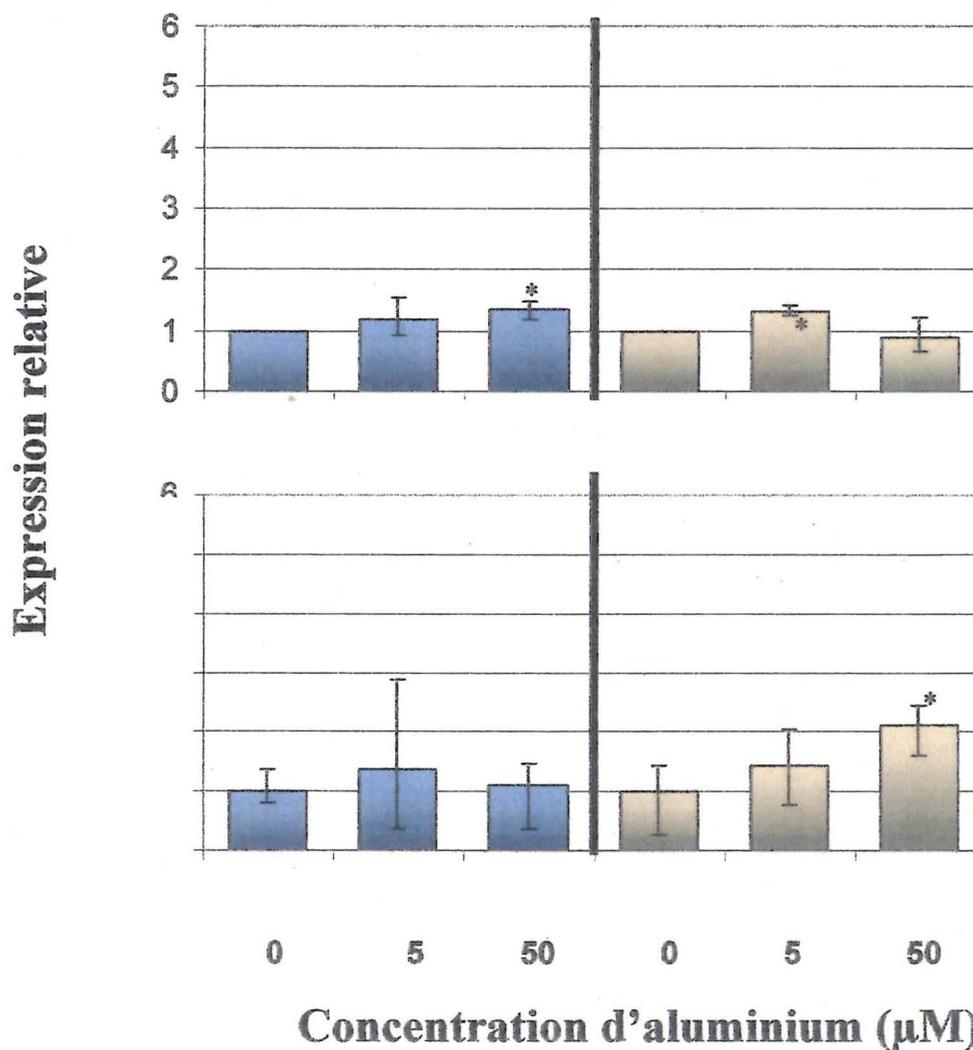


Figure 4.8 : Niveau d'expression relatif pour ACS en fonction de la concentration d'exposition à l'Al pour les cultivars Atlas66 et Bounty pour 6 h et 24 h d'exposition. Les résultats pour les cultivars Atlas66 et Bounty sont représentés par les histogrammes bleus et orange respectivement. Ces résultats sont exprimés en unité relative au point Atlas66 0 μM qui représente un niveau relatif ajusté à 1. Ils sont tirés des analyses faites par qRT-PCR avec les amorces ACCs_547RL_455FU/ ACCs_547RL. Les expériences ont été réalisées en triplicat ($*** P < 0.001$; $** P < 0.01$; $* P > 0.05$).

Après 6 heures d'expositions à l'Al, *Aco* a montré une répression non-significative chez le cultivar Atlas66 jusqu'à un facteur 0.5 à 50 μM d'Al tandis que l'on constate une induction de facteur 2 puis de facteur 3 pour des expositions 5 μM et 50 μM d'Al respectivement pour le cultivar Bounty. Après 24 heures d'expositions, *Aco* n'a montré aucune différence significative chez Atlas66 après des expositions à 5 et 50 μM d'Al tandis que l'on a constaté une répression du gène *Aco* pour 50 μM d'Al d'exposition pour le cultivar Bounty (Fig. 4.9).

Chez la tomate *Le-ACS3* a montré une induction en réponse au stress hydrique (Olson *et al.*, 1995). Plus récemment, 3 isoformes de l'*Acs* ont été identifiés chez *Arabidopsis* dans les racines. Ces trois gènes sont induits de manière commune ou individuelle en réponse aux stress salin, au froid, à l'obscurité ou à la chaleur, aux blessures et suite à l'application des hormones acide abscissique (ABA), GA, (gibbérelline) et IAA (Wang *et al.*, 2005). Les ACS semblent être impliqués dans des mécanismes de défense à des composantes communes de stress. Chez le blé, *Acs* ne semble pas être induit par l'Al aux vues des résultats obtenus pour 6 h et 24 h d'exposition. Cependant ceci n'exclut pas, la participation plus active de l'enzyme ACC synthase puisque certains mécanismes limitant son action interviennent aussi de manière post-traductionnelle tel que la phosphorylation et pourrait expliquer une augmentation de la quantité d'ACC sans augmenter le nombre de transcrit *Acs* (Liu et Zhang, 2004).

Tout comme pour l'*Acs*, des isoformes de *Aco* sont présentes dans les racines de tabac et de pomme de terre et sont induites en réponse à de nombreux stress biotiques et abiotiques (Kim *et al.*, 1998; Zanetti *et al.*, 2002). Chez le blé, l'*Aco* présente une induction allant jusqu'à 3 fois mais est non-significative à 6 h d'exposition à 5 et 50 μM d'Al chez le cultivar sensible de blé. Cependant le grand écart type observé peut être expliqué par différents facteurs. L'induction de la mort cellulaire provoquée par l'Al n'était peut être pas synchronisée chez les réplicats à 6 h. De plus, la mort cellulaire n'est pas uniforme dans tous les tissus et ne touche que la zone d'élongation par îlots de cellules (Delisle *et al.*, 2001). Il est fort probable que lors de la mort des cellules, les différents ARN se dégradent rapidement. Ainsi, si les gènes codants pour l'ACS ou l'ACO sont surexprimés principalement dans les

cellules épidermiques destinées à mourir (mort programmée), les transcrits de ces gènes seront beaucoup plus affectés par la mort cellulaire non synchrone que les transcrits exprimés dans la majorité des tissus de la pointe racinaire.

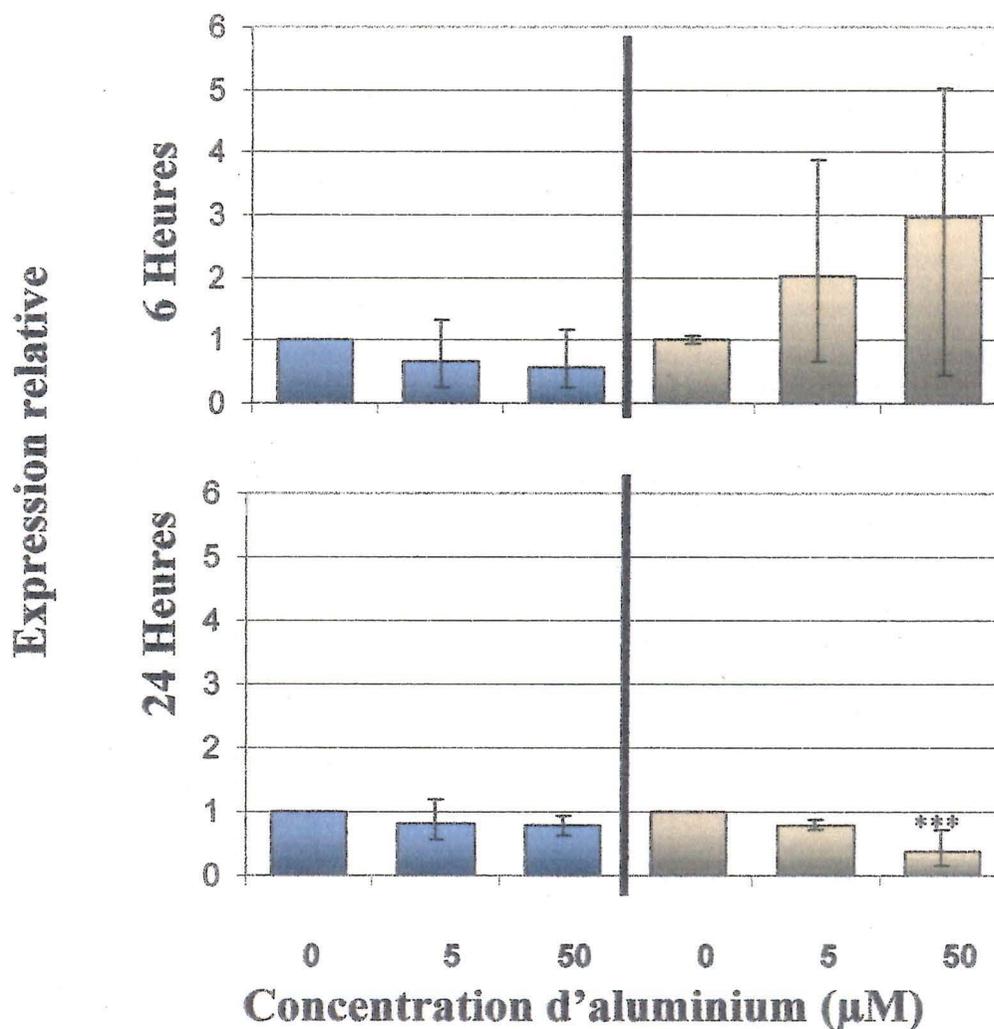


Figure 4.9: Niveau d'expression relatif de *Aco* en fonction de la concentration d'exposition à l'Al pour les cultivars Atlas66 et Bounty pour 6 h et 24 h d'exposition.

Les résultats pour les cultivars Atlas66 et Bounty sont représentés par les histogrammes bleus et oranges respectivement. Ces résultats sont exprimés en unité relative au point Atlas66 0 µM qui représente un niveau relatif ajusté à 1. Ils sont tirés des analyses faites par qRT-PCR avec les amorces ACCo_816RL_778FU/ ACCo_816RL. Les expériences ont été réalisées en triplicat (***) P<0.001; ** P<0.01; * P>0.05).

L'écart-type observé pour la mesure du niveau d'expression de ces gènes peut donc être beaucoup plus variable que pour d'autres gènes exprimés dans l'ensemble des cellules ou mesurés avant la mort des cellules. Afin de démontrer que l'augmentation observée est réelle, il sera nécessaire de mesurer le niveau d'expression à différents temps (2h, 4h et 6 h) en augmentant le nombre de réplicats pour tenir compte des limitations associées au phénomène de mort cellulaire.

L'absence d'induction significative chez les 2 gènes après 24 h d'exposition à l'Al peut être expliquée par le phénomène de mort cellulaire qui dégrade les transcrits dans les cellules mortes. Cela suggère que les transcrits ne sont pas surexprimés dans les autres types cellulaires et que l'induction n'est donc pas maintenue dans le temps à cause de la disparition des cellules exprimant ces gènes lors de leur mort. Les résultats de Kim *et al.* (2003) chez *Arabidopsis* montrent une induction perceptible du gène *Acs* par analyse northern après 6 h et jusqu'à 12h d'exposition au dexaméthasone. Pour le transcrit *Aco*, la période d'induction est comprise entre 4 h et 12h. La présence des deux gènes ne peut plus être détectée après 24 h d'exposition au dexaméthasone (composé servant à induire la mort cellulaire autant chez les cellules animales que végétales). Il est également possible que l'induction de la mort cellulaire par l'Al, visible après seulement 8 h d'exposition (Delisle *et al.*, 2001) ne suive pas la même cinétique que le dexaméthasone chez *Arabidopsis*.

Les résultats observés ne nous permettent pas de lier la synthèse de l'éthylène et la mort cellulaire à l'induction des gènes *Acs* et *Aco* en réponse à l'Al. Cependant, d'autres mécanismes peuvent intervenir dans la synthèse de l'éthylène tel que la phosphorylation post-traductionnelles des protéines ACS et ACO. D'autre part, la mort cellulaire induite via les mécanismes de signalisation emprunté par l'éthylène a pu être activée par un autre messenger. L'acide jasmonique a déjà montré cette capacité indépendamment de l'éthylène (Turner *et al.*, 2002). Tout comme l'acide jasmonique, un messenger induit par l'Al pourrait activer cette voie de signalisation indépendamment de l'éthylène.

4.2 Expression des gènes impliqués dans le métabolisme de l'auxine et l'éthylène après exposition à l'Al à l'aide d'une puce à ADN

Le laboratoire a exploité la technologie des puces à ADN afin d'analyser l'expression des gènes chez les plantes sensibles et tolérantes exposées à des concentrations d'Al causant une ICR de 50 %. La puce à ADN a été réalisée à partir de 61 115 contigs représentés en moyenne par 11 amorces couvrant la séquence pour chaque contig. L'hybridation sur la plaque contenant ces amorces a été réalisée à partir de la rétro-transcription d'ARN extrait de pointe de racines de blé Atlas66 et Bounty exposé à l'Al pendant 24 h. Partant de cette importante banque de séquences dont le profil d'expression est disponible, on a évalué le potentiel de plusieurs voies d'intérêt dans le projet au travers de l'expression des gènes qui sont reliés au métabolisme de l'auxine et de l'éthylène.

L'Al bloque le transport de l'auxine et induit une inhibition de croissance dans les racines (Hasenstein et Evans, 1988). L'inhibition de croissance causée par l'auxine est souvent associée à l'action conjointe ou induite de l'éthylène. Ces mécanismes intervenant dans la croissance ont été mis en évidence à plusieurs reprises à l'aide de différents mutants chez *Arabidopsis*. La mutation conférant une résistance à l'une des hormones a été souvent associée à une résistance pour l'autre hormone (Rahman *et al.*, 2001; Alonso et Ecker, 2001). Dans les racines, la production de ROS a déjà été corrélée avec l'inhibition de croissance provoquée par l'auxine (Joo *et al.*, 2001) ou l'éthylène (Lee et Lin, 1996) dans les racines. Plusieurs gènes induits par l'Al ont été associées à une réponse aux pathogènes ou au stress oxydatif (Hamel *et al.*, 1998; Richards *et al.*, 1998) mais sans montrer de différence d'expression entre les cultivars sensibles et tolérants pour des ICR comparables. Cependant, les voies d'action de l'auxine et de l'éthylène peuvent converger vers une interaction et une réponse commune (Stepanova et Ecker, 2000). Leur mode de transport et de signalisation sont toutefois très différents (voir 2. État des connaissances). Il paraît donc intéressant d'évaluer l'expression des gènes impliqués dans les voies de transport et de signalisation de l'auxine, et dans les voies de synthèse et de signalisation de l'éthylène.

On a donc utilisé les mêmes démarches bioinformatiques que pour les gènes de synthèse de l'éthylène. Pour les gènes uniquement caractérisés chez *Arabidopsis*, on a utilisé la séquence protéique pour identifier tout d'abord une séquence homologue chez le riz (International Rice Genome Sequencing Project., 2005). Le riz est utilisé comme intermédiaire dans la recherche de gènes homologues aux gènes d'*Arabidopsis* car c'est une monocotylédone comme le blé. À partir de la séquence d'ADN du riz, on a effectué une recherche pour trouver la séquence la plus proche chez le blé. À partir de la première séquence trouvée dans TIGR, on a effectué un BLASTn dans la base de données de Affymetrix pour trouver les gènes correspondants sur la puce à ADN. Les séquences ont été triées par classe de gènes d'intérêt. Pour les gènes caractérisés chez le riz ou le maïs, on a effectué des BLASTn directement à partir de la séquence d'ADN. J'ai ainsi réalisé un inventaire représentant les séquences d'intérêt par classe et par type de gène pour le transport, la signalisation ou l'induction liées à l'auxine ou à l'éthylène (Tableaux 4.3 à 4.7 et 4.9, 4.10). Les gènes induits en réponse à l'auxine seront séparés en deux catégories, les gènes ayant une réponse plus rapide (précoces) et ceux ayant une réponse plus tardive (secondaires).

4.2.1 Réponses moléculaires associées à l'auxine

Pour le transport de l'auxine, j'ai sélectionné 8 groupes de gènes (*PIN2*, *AUX1*, *PINs*, *MRP1*, *APM*, *APP*, *MDRs* et *ABCs*) qui sont représentés par plusieurs séquences différentes selon la famille de gènes impliqués. Ainsi on dénombre jusqu'à 55 séquences pour le groupe des *ABCs* (Tableau 4.3). Les séquences *Ta.2793.1.S1_at* et *Ta.7999.2.S1_at*, associées respectivement au groupe des *MDRs* et des *ABCs* ont montré des variations d'expression en réponse à l'Al. Dans les pointes de racines, l'expression de *Ta.2793.1.S1_at* est augmentée d'un facteur 7 chez le cultivar Atlas66 après une exposition à 50 μM d'Al et d'un facteur 4 chez le cultivar Bounty après une exposition à 5 μM d'Al (Tableau 4.6).

Pour la signalisation en réponse à l'auxine, j'ai identifié 5 groupes de gènes (*AXR1*, *TIR1*, *ABPs*, *Rho/RACs* et l'*Ubiquitine ligase E3*) qui sont représentés par un nombre de

séquences variant de 8 pour l'*Ubiquitine ligase E3* et *TIR1* jusqu'à 18 séquences pour le groupe des *ABPs* (Tableau 4.4). Aucun des gènes identifiés n'a montré de variation d'expression en fonction d'une exposition à l'Al. Pour les gènes précoces induits par l'auxine, j'ai identifié 4 groupes de gènes : *ARFs*, *AUX/IAAs*, *GH3s* et les *SAURs* qui sont représentés par un nombre de séquences variant de 9 pour le groupe des *GH3s*, jusqu'à 22 pour le groupe des *AUX/IAAs* (Tableau 4.5). La séquence *Ta.6746.1.S1_at* associée au groupe des *ARFs*, et les séquences *Ta.5490.2.S1_at* et *Ta.5490.3.S1_at* associées au groupe des *GH3s* a montré des variations d'expression en fonction de l'Al. Dans les pointes de racines, l'expression de *Ta.6746.1.S1_at* est augmentée d'un facteur 2.6 chez le cultivar Atlas66 après une exposition à 50 μM d'Al et d'un facteur 1.4 chez le cultivar Bounty après une exposition à 5 μM d'Al. L'expression de *Ta.5490.2.S1_at* est augmentée d'un facteur 2.2 chez le cultivar Atlas66 après une exposition à 50 μM d'Al et d'un facteur 2.9 chez le cultivar Bounty après une exposition à 5 μM d'Al. L'expression de *Ta.5490.3.S1_at* est augmentée d'un facteur 1.6 chez le cultivar Atlas66 après une exposition à 50 μM d'Al et d'un facteur 2 chez le cultivar Bounty après une exposition à 5 μM d'Al (Tableau 4.6).

Pour les gènes secondaires induits l'auxine, j'ai sélectionné 6 gènes ou groupes de gènes *ATP binding Kinase*, *Glutathione S-transferases (GSTs)*, *cystéine protéase*, *Heat shock protein (HSP)* et des gènes possédant un DUF (Domain unknown function), *DUF313* et *DUF cytb561* qui sont représentés pour un nombre de séquences variant de 2 pour les cystéines protéase jusqu'à 60 séquences pour le groupe des *GSTs* (Tableau 4.7). Les séquences *Ta.24150.1.S1_at*, *Ta.3118.1.S1_at*, *Ta.25382.1.S1_at* et *Ta.8545.1.S1_at*, associées au groupe des *GSTs* ont montré des variations d'expression en fonction de l'Al. Dans les pointes de racines, l'expression de *Ta.24150.1.S1_at* est augmentée d'un facteur 3 chez le cultivar Atlas66 après une exposition à 50 μM d'Al et d'un facteur 2.4 chez le cultivar Bounty après une exposition à 5 μM d'Al (Tableau 4.6). L'expression de *Ta.3118.1.S1_at* est augmentée d'un facteur 2.5 chez le cultivar Atlas66 après une exposition à 50 μM d'Al et d'un facteur 1.4 chez le cultivar Bounty après une exposition à 5 μM d'Al. L'expression de *Ta.25382.1.S1_at* est augmentée d'un facteur 5 chez le cultivar Atlas66 après une exposition à 50 μM d'Al et d'un facteur 6 chez le cultivar Bounty après une exposition à 5 μM d'Al. L'expression de *Ta.8545.1.S1_at* est augmentée d'un facteur 3 chez le cultivar Atlas66 après

une exposition à 50 μM d'Al et d'un facteur 1.7 chez le cultivar Bounty après une exposition à 5 μM d'Al.

Toutes les séquences identifiées montrant une induction statistiquement significative (Tableau 4.6) en réponse à l'Al, ont fait l'objet d'une analyse bio-informatique similaire à celle utilisée dans la section 4.1, afin de dessiner des amorces pour effectuer le qRT-PCR (Tableau 3.3). Les critères nécessaires pour la production des amorces ont permis de sélectionner des amorces pour 8 des 14 gènes présentés dans le Tableau 4.6 (voir Tableau 4.3). Cependant, les tests de validations pour ces gènes n'ont permis de valider des amorces que pour 4 de ces gènes (Tableau 4.6 et 4.8) car les séquences disponibles sont courtes et ne permettent pas de sélectionner de nouvelles amorces. Il sera nécessaire de cloner les gènes complets correspondant à ces gènes afin de poursuivre leurs analyses

Tableau 4.3 : Inventaire de séquences homologues aux gènes impliqués dans le transport de l'auxine. Les séquences identifiées par homologie avec des gènes d'intérêt sont compilées dans ce tableau. Les séquences présentant un profil d'expression de facteur supérieur ou égal à 2 dans la puce à ADN, sont indiqués en rouge

GÈNE	SEQUENCE ID	RÉFÉRENCES
PIN2	Ta.30665.1.SI_at; Ta.27508.1.AI_at; TaAffx.18065.1.SI_at	Muller et al., 1998
AUX1	TaAffx.38393.1.SI_at; TaAffx.79076.1.SI_at; TaAffx.75697.1.AI_s_at; TaAffx.38393.1.SI_at	Bennet et al., 1996
PIN	Ta.9388.1.SI_a_at; Ta.9388.3.SI_a_at; Ta.8449.1.AI_at; Ta.26837.1.AI_at; Ta.30460.1.SI_at	Geldner et al., 2001
MRP1	TaAffx.60852.1.AI_at	Lu et al., 1997
APM1	Ta.5246.3.SI_at; Ta.5246.2.AI_x_at; Ta.5246.2.AI_a_at; Ta.5246.1.AI_x_at; Ta.5246.1.AI_at	Murphy et al., 2001
APP1	Ta.23391.1.SI_at	Murphy et al., 2001
MDR	Ta.10541.1.SI_at; Ta.2793.1.SI_at	Noh et al., 2001; Sasaki et al., 2002
ABC	Ta.9385.2.SI_x_at; Ta.9385.2.SI_at; Ta.9385.1.AI_at; Ta.8676.1.AI_at; Ta.8535.1.SI_at; Ta.8265.1.AI_at; Ta.8232.1.AI_at; Ta.7999.3.SI_at; Ta.7999.2.SI_a_at; Ta.7999.2.SI_a_at; Ta.7999.1.SI_at; Ta.7799.1.AI_at; Ta.7723.1.AI_at; Ta.634.1.SI_at; Ta.5630.3.SI_at; Ta.5630.2.SI_x_at; Ta.5630.2.SI_a_at; Ta.5630.1.SI_at Ta.5242.2.SI_at Ta.5242.1.AI_at; Ta.5160.1.SI_at; Ta.4913.3.SI_a_at; Ta.4913.2.AI_at; Ta.4913.1.SI_at; Ta.4821.2.SI_at; Ta.4821.1.AI_at; Ta.3697.1.SI_at; Ta.30056.1.SI_at; Ta.2956.2.SI_at; Ta.2956.1.AI_at; Ta.2914.1.SI_at; Ta.28668.1.SI_at; Ta.27867.1.SI_at; Ta.26962.1.AI_at; Ta.26809.1.AI_at; Ta.26600.1.AI_at; Ta.25533.1.SI_at; Ta.24899.2.AI_at; Ta.23299.3.AI_at; Ta.23299.1.SI_at; Ta.22312.1.SI_at; Ta.21281.3.AI_at; Ta.21281.1.SI_at; Ta.16241.1.SI_at; Ta.12928.1.AI_at; Ta.12808.2.SI_at; Ta.12808.1.SI_at; Ta.12398.1.AI_s_at; Ta.12038.1.AI_at; Ta.11967.1.SI_at; Ta.11748.2.AI_a_at; Ta.11260.1.SI_at; Ta.10541.1.SI_at; Ta.10325.1.SI_at; TaAffx.11437.1.SI_at	Higgins, 1992

Tableau 4.4: Inventaire des séquences homologues aux gènes impliqués dans la signalisation en réponse à l'auxine.
Légendes : voir Tableau 3

GÈNE	SEQUENCE ID	RÉFÉRENCES
<i>AXR1</i>	Ta.7558.3.SI_a_at; Ta.7558.2.SI_x_at; Ta.7558.2.SI_a_at; Ta.7558.1.SI_at; Ta.25102.1.AI_at; TaAffx.24991.1.SI_at; TaAffx.24991.1.SI_x_at; TaAffx.5266.1.SI_at; Ta.2419.3.SI_x_at; Ta.2419.2.SI_at; Ta.17076.2.SI_x_at; Ta.17198.1.SI_at; Ta.10439.1.AI_at	Lincoln <i>et al.</i> , 1990
<i>TIR1</i>	Ta.21131.1.SI_a_at; Ta.21131.1.SI_x_at; Ta.21131.2.AI_at; Ta.23215.1.SI_at; Ta.23215.2.AI_at; Ta.3802.2.AI_at; TaAffx.30067.1.SI_at; TaAffx.111733.1.SI_at;	Ruegger <i>et al.</i> , 1998
<i>ABP</i>	Ta.14175.1.SI_at; Ta.7454.2.SI_a_at; Ta.7454.2.SI_at; Ta.6735.1.SI_at; Ta.3685.1.SI_at; Ta.24760.1.SI_at; Ta.21722.1.SI_at; Ta.30507.1.SI_x_at; TaAffx.24660.1.SI_at; Ta.9343.2.SI_a_at; Ta.9343.1.SI_at; Ta.996.2.SI_at; Ta.6649.1.SI_at; Ta.25564.2.SI_at; Ta.25564.2.SI_a_at; Ta.16915.1.SI_at; TaAffx.98017.1.SI_at; TaAffx.114295.2.SI_at;	Lammer <i>et al.</i> , 1998
<i>Rho/RAC</i>	Ta.10240.1.SI_at; Ta.10240.1.SI_x_at; Ta.10240.2.SI_at; Ta.10240.2.SI_x_at; Ta.20932.1.SI_at; Ta.23421.1.AI_at; Ta.7476.1.SI_at; Ta.19319.1.SI_x_at; Ta.19319.2.SI_a_at; Ta.19319.2.SI_at; Ta.9247.1.SI_at; Ta.9247.2.SI_at; Ta.6327.1.SI_at; Ta.6327.3.SI_a_at; Ta.6327.1.SI_at; Ta.6327.3.SI_a_at	Tao <i>et al.</i> , 2002
<i>Ubiquitine ligaseE3</i>	Ta.3950.1.AI_at; Ta.7138.1.SI_at; Ta.28290.1.SI_at; Ta.28290.1.SI_x_at; TaAffx.112423.1.SI_at; Ta.7138.1.SI_at; TaAffx.91380.1.AI_at; TaAffx.23311.1.SI_at	Bates et Vierstra, 1999

Tableau 4.5: Inventaire des séquences homologues aux gènes précoces induits par l'auxine.
Légendes : voir Tableau 3

GÈNE	SEQUENCE ID	RÉFÉRENCES
ARF	Ta.28852.1.SI_at ; Ta.8605.1.AI_at ; Ta.25087.1.SI_at ; Ta.8537.1.SI_s_at ; Ta.2593.1.SI_at ; Ta.2593.2.SI_at ; Ta.2593.2.SI_x_at ; Ta.2593.3.SI_x_at ; Ta.6394.1.AI_at ; Ta.15664.1.SI_at ; Ta.9707.1.SI_at ; Ta.9707.1.SI_x_at ; Ta.9707.2.AI_at ; Ta.6906.2.SI_at ; Ta.28513.1.SI_s_at ; Ta.6746.1.SI_at ; Ta.6906.1.AI_at ; Ta.8979.1.AI_at ; Ta.9398.1.SI_a_at ; Ta.9398.1.SI_at ; Ta.9398.2.SI_at ; TaAffx.89243.1.SI_at	Ulmasov et al., 1999; Overvoorde et al., 2005
AUX/IAA	Ta.10032.1.SI_a_at ; Ta.10032.3.SI_at ; Ta.17399.1.AI_at ; Ta.3164.1.SI_at ; Ta.3164.1.SI_x_at ; Ta.3164.2.SI_at ; Ta.3164.2.SI_s_at ; Ta.3164.3.SI_a_at ; Ta.3164.3.SI_at ; Ta.3164.3.SI_x_at ; Ta.9390.1.AI_at ; Ta.9390.2.SI_at ; Ta.3163.1.SI_at ; Ta.1890.1.SI_x_at ; Ta.1890.2.SI_a_at ; Ta.1890.3.SI_x_at ; Ta.18018.1.SI_at ; Ta.23069.1.SI_at ; Ta.23069.2.SI_a_at ; Ta.23069.2.SI_x_at ; Ta.26004.1.AI_at ; Ta.26004.1.AI_x_at	Overvoorde et al., 2005
GH3	Ta.4458.1.AI_at ; Ta.4458.2.SI_at ; Ta.4110.1.SI_at ; Ta.29293.1.SI_at ; Ta.5490.1.SI_at ; Ta.5490.1.SI_s_at ; Ta.5490.1.SI_x_at ; Ta.5490.2.SI_at ; Ta.5490.3.SI_at ;	Overvoorde et al., 2005
SAUR	Ta.8890.1.SI_a_at ; Ta.8890.1.SI_x_at ; Ta.8890.3.SI_at ; Ta.8890.3.SI_x_at ; Ta.10572.1.SI_at ; Ta.18811.1.SI_at ; Ta.18273.1.SI_at ; Ta.18723.1.SI_x_at ; Ta.21285.1.AI_at ; Ta.21285.1.AI_s_at ; Ta.30474.1.AI_at ; Ta.30488.1.AI_at ; Ta.30488.1.AI_x_at ; TaAffx.37533.1.AI_at	Overvoorde et al., 2005

Tableau 4.6 : Inventaire des gènes et niveaux d'expression provenant des résultats de la puce à ADN. Les séquences pour lesquelles une induction a été observée pour un gène d'intérêt ont été associées dans ce tableau à leur classe de gène et leur facteur d'induction par l'analyse des puces à ADN. Les résultats de validation des paires d'amorces testées sont présentés.

CLASSE	SEQUENCE ID	Facteur d'induction après exposition à l'AI		ANNOTATION	Amorces	Amorces spécifiques
		ATLAS66 +AI/Contrôle	BOUNTY +AI/Contrôle			
Transport de l'Auxine	Ta.2793.1.S1_at	6,92***	4,35***	MDR	NON	NON
	Ta.7999.2.S1_at	1,85*	3,02***	ABC	ABC	NON
Gènes précoces en réponse à l'auxine	Ta.6746.1.S1_at	2,61**	1,42*	ARF7	ABC.A	OUI
	Ta.5490.3.S1_at	2,19**	2,89**	GH3 protein, putative (DFL-1)	GEN6	NON
	Ta.5490.2.S1_at	1,59*	2,14**	GH3 protein, putative (DFL-1)	GEN8	NON
Gènes secondaires en réponse à l'auxine	Ta.24150.1.S1_at	3,13*	2,39*	Gluthatione-S Transférase	NON	NON
	Ta.3118.1.S1_at	2,56**	1,41 +++	Gluthatione-S Transférase	NON	NON
	Ta.25382.1.S1_at	5,31***	6,14***	Gluthatione-S Transférase	NON	NON
	Ta.8545.1.S1_at	3,08***	1,72 +++	Gluthatione-S Transférase	NON	NON
Synthèse de l'éthylène	Ta.28233.1.S1_at	4,76***	6,30***	EFE Dioxygenase	GEN1	NON
	Ta.1827.1.S1_x_at	1,69**	3,54*** ++	EFE Dioxygenase	GEN1.A	OUI
	Ta.1827.3.A1_a_at	1,65***	3,77*** ++	EFE Dioxygenase	GEN2	NON
Signalisation de l'éthylène	Ta.6797.1.A1_at	2,52***	1,37	SAMd	GEN2.A	OUI
	Ta.8281.1.S1_at	1,24*	2,61*** +	Ethylene-Responsive-Element-Binding-Protein (EREBP)	GEN3	NON
				SAM	GEN3.A	NON
				SAMd	SAM	OUI
				Ethylene-Responsive-Element-Binding-Protein (EREBP)	SAM.A	OUI
				Ethylene-Responsive-Element-Binding-Protein (EREBP)	EREBP	NON
				Ethylene-Responsive-Element-Binding-Protein (EREBP)	EREBP.A	NON

Anova (+AI/Contrôle): *** P<0.001

Anova (Atlas+AI/Bounty+AI): +++ P<0.001

** P<0.01

++ P<0.01

* P<0.05

+ P<0.05

Tableau 4.7: Inventaire des séquences homologues aux gènes secondaires induits en réponse à l'auxine.
Légendes : voir Tableau 3

GÈNE	Sequence ID	RÉFÉRENCES
ATP Binding T/S KINASE	Ta.21498.1.SI_at ; Ta.30021.1.AI_at; Ta.30021.1.AI_x_at	XP_479146.1
GST	Ta.12341.1.SI_at; Ta.12962.1.SI_at; Ta.15016.1.SI_at; Ta.15588.1.SI_at; Ta.15592.1.SI_at; Ta.16446.1.SI_at; Ta.17854.1.SI_at; Ta.1830.2.SI_x_at; Ta.18648.1.SI_at; Ta.1869.1.SI_at; Ta.1878.1.SI_at; Ta.1878.2.SI_at; Ta.1878.2.SI_x_at; Ta.18883.1.SI_at; Ta.18883.2.SI_a_at; Ta.18883.2.SI_at; Ta.19253.1.SI_at; Ta.20599.1.AI_at; Ta.1878.3.SI_at; Ta.22191.1.SI_at; Ta.24150.1.SI_at ; Ta.28219.1.AI_at; Ta.28219.2.SI_at; Ta.303.1.SI_at; Ta.303.1.SI_x_at; Ta.303.2.SI_at; Ta.303.2.SI_x_at; Ta.30753.1.AI_at; Ta.303.3.SI_at; Ta.3118.1.SI_at ; Ta.3118.1.SI_at; Ta.3118.2.SI_at; Ta.303.3.SI_x_at; Ta.240.1.SI_a_at; Ta.25357.1.AI_at; Ta.25377.1.SI_at; Ta.25382.1.SI_at ; Ta.25522.1.SI_at; Ta.25754.1.AI_at; Ta.25828.1.AI_at; Ta.25838.1.AI_at; Ta.3628.1.SI_a_at; Ta.3628.1.SI_at; Ta.3628.1.SI_x_at; Ta.3628.2.SI_x_at; Ta.6810.1.SI_a_at; Ta.6810.1.SI_at; Ta.6810.2.SI_at; Ta.6810.3.SI_x_at; Ta.26344.1.AI_at; Ta.30922.1.SI_at; Ta.8545.1.SI_at ; Ta.9599.1.SI_a_at; TaAffx.57351.1.SI_at; Ta.10582.1.SI_x_at ; Ta.10582.2.SI_a_at; Ta.10582.2.SI_at; Ta.10582.3.SI_at; TaAffx.105609.1.SI_at; TaAffx.105609.1.SI_at; Ta.15781.1.SI_at ; Ta.8766.1.SI_at	Takahashi et Nagata, 1992
Cystein protease OTU		AAO63317.1
DUF313	Ta.4568.1.AI_at ; Ta.4568.2.SI_at; Ta.13186.1.SI_x_at	XP_483413.1
DUF Cytb561	Ta.16218.1.AI_a_at ; Ta.16218.1.AI_x_at; Ta.4104.1.SI_at; Ta.4104.1.SI_s_at	XP_483411.1
HSP	Ta.27873.1.AI_at; Ta.28772.1.SI_at; Ta.6737.2.SI_a_at; Ta.6737.3.AI_at; Ta.8235.1.AI_at	NP_921505.1

La séquence *Ta.7999.2.S1_at*, homologue à *ABC* a permis le dessin de 2 paires d'amorces annotées ABC/ABC.A. Toutes les paires d'amorces utilisées pour le qRT-PCR sont accompagnées des compléments 'F' (Forward = sens) et 'R' (reverse = anti-sens). Les séquences *Ta.6746.1.S1_at* et *Ta.5490.2.S1_at*, qui sont homologues aux gènes *ARF7* et *GH3* ont permis le dessin d'une seule paire d'amorces en suivant les restrictions du qRT-PCR, annotés GEN6 et GEN8 (Tableau 3.3 et Tableau 4.6). Cependant, seule la paire amorce ABC.A a été retenue selon les tests de spécificité et a montré une efficacité de 94 %. Les tests sur gel ou par la droite dérivée de la courbe de dissociation sur qRT-PCR n'ont pas permis de valider les autres amorces. Les gènes *Ta.24150.1.S1_at*, *Ta.3118.1.S1_at*, *Ta.25382.1.S1_at* et *Ta.8545.1.S1_at*, homologues aux *GSTs* ont été étudiés dans le cadre d'un autre projet (Houde et Iguiliz, 2007). Deux des gènes homologues aux *GST* ont été associées de façon significative (Tableau 4.6) à la tolérance à l'Al sur la puce à ADN et l'expression différentielle du gène *Ta.8545.1.S1_at*, a été testée par qRT-PCR.

L'expression du gène *ABC* n'a pas montré de différence significative (Fig. 4.10). D'autre part, la séquence *Ta.2793.1.S1_at* a été associée au gène *AtMDR1*, dont l'expression inductible par l'Al a déjà été démontrée (Sasaki *et al.*, 2002). Le profil d'expression de cette séquence n'a pas été poursuivi. Les transporteurs *ABC* (incluant les *MDR*) sont souvent induits par différents stress (Sasaki *et al.*, 2002; Alvarado *et al.*, 2004) et parfois associées à la résistance aux stress (Larsen *et al.*, 2005; Ito et Gray, 2006). Chez *Arabidopsis*, le mutant *als3*, conférant une plus grande sensibilité à l'Al, est le résultat de l'inactivation d'un gène transporteur *ABC* inductible par l'Al (Larsen *et al.*, 2005).

Les séquences *Ta.6746.1.S1_at* et *Ta.5490.2.S1_at*, homologues aux gènes *ARF* et *GH3*, induites en réponse à l'Al selon la puce à ADN, mais ils n'ont pas pu être validés par qRT-PCR faute d'avoir pu dessiner des amorces spécifiques. Chez *Arabidopsis*, la mutation de *ARF7* (connue comme *nhp4/arf7*) et de *ARF19* (*arf19*), a été associée à une résistance à l'auxine et à l'éthylène dans les racines, indiquant ainsi leur importance dans les réponses croisées des deux hormones (Li *et al.*, 2006).

GH3 est connu pour être inductible en réponse à l'auxine spécifiquement dans les racines (Gee *et al.*, 1991). Des gènes présentant de fortes homologies avec les *GH3* ont également montré une activité inactivatrice pour l'acide jasmonique. Ces gènes pourraient intervenir comme régulateurs de l'action de plusieurs hormones (Staswick *et al.*, 2002). Ces deux gènes induits en réponse précoces à l'auxine semblent être impliqués dans une réponse de stress commun. Leur induction supporte les résultats antérieurs (Kollmeier *et al.* 2000) indiquant qu'il y a une accumulation d'auxine dans les pointes racinaires en présence d'Al chez le blé tout comme chez *Arabidopsis*. Cette accumulation pourrait donc être associée à l'inhibition de croissance observée en réponse à l'Al.

Les analyses par qRT-PCR pour le gène *Ta.8545.1.S1_at*, homologue à une *GST*, ont été réalisées en parallèle à ce projet par un autre étudiant (Houde et Iguiliz, 2007). L'expression de ce gène augmente par un facteur 2.8 dans les pointes de racines du cultivar Atlas66 entre les conditions non exposées et exposées à 50 μM d'Al pendant 24 h. L'expression de ce gène augmente d'un facteur 1.8 dans les pointes de racines du cultivar Bounty entre les conditions non exposées et exposées à 5 μM d'Al pendant 24 h. En complément d'expérience le ratio de transcrits entre le cultivar tolérant exposé à 50 μM d'Al et le cultivar sensible exposé à 5 μM d'Al a également été calculé. Le cultivar tolérant exprime 6.3 fois plus de transcrits que le cultivar sensible dans les mêmes conditions d'ICR (Houde et Iguiliz, 2007). Les *GST* sont des protéines multifonctionnelles, impliquées généralement dans la détoxification des xénobiotiques, ubiquitaires et codés par d'importantes familles de gènes (Frova, 2003). Certaines *GST* ont déjà été identifiées comme étant induites par l'Al chez *Arabidopsis* (Richards *et al.*, 1998), chez le tabac (Ezaki *et al.*, 1995) et chez le blé (Snowden *et al.*, 1995). Chez *Arabidopsis*, *AtGSTF2* inductible par l'éthylène, a montré une induction à différents stress (dont l'auxine) chez le mutant insensible à l'éthylène *etr1* (Smith *et al.*, 2003). L'induction de certaines *GSTs* semblent être liée aux voies de signalisation des deux hormones. Des études plus poussées sur les isoformes potentielles identifiées dans cette étude devraient nous permettre de distinguer les différents gènes induits par l'Al et leur relations avec les voies de signalisation associées à l'auxine et à l'éthylène.

4.2.2 Réponses moléculaires associées à l'éthylène

Dans la problématique liée à l'éthylène, d'autres isoformes des gènes *Aco* et *Acs* existent et auraient pu être détectées par les puces à ADN. Il en va de même pour plusieurs autres gènes impliqués dans la synthèse ou la signalisation de l'éthylène. C'est pourquoi, pour les gènes impliqués dans la synthèse de l'éthylène, j'ai sélectionné 4 gènes ou groupes de gènes : *Aco*, *Acs*, SAM décarboxylase (*SAMd*) et Ethylene-forming-enzyme (*EFE*) dioxygenase qui sont représentés par un nombre de séquences variant de 1 pour *SAMd* jusqu'à 16 pour le groupe des dioxygénases (Tableau 4.9). L'analyse de l'expression des gènes sur la puce à ADN a montré que les séquences *Ta.28233.1.S1_at*, *Ta.1827.3.A1_a_at*, *Ta.1827.1.S1_x_at*, associées aux *EFE* dioxygenases, et *Ta.6797.1.A1_at* associée au gène *SAMd* ont montré une variation d'expression en fonction de l'Al. *Ta.28233.1.S1_at* est augmentée d'un facteur 4.8 chez le cultivar Atlas66 après une exposition à 50 μ M d'Al et d'un facteur 6.3 chez le cultivar Bounty après une exposition à 5 μ M d'Al (Tableau 4.6). L'expression de *Ta.1827.3.A1_a_at* est augmentée d'un facteur 1.7 chez le cultivar Atlas66 après une exposition à 50 μ M d'Al et d'un facteur 3.8 chez le cultivar Bounty après une exposition à 5 μ M d'Al. L'expression de *Ta.1827.1.S1_x_at* est augmentée d'un facteur 1.7 chez le cultivar Atlas66 après une exposition à 50 μ M d'Al et d'un facteur 3.5 chez le cultivar Bounty après une exposition à 5 μ M d'Al. L'expression de *Ta.6797.1.A1_at* est augmentée d'un facteur 2.5 chez le cultivar Atlas66 après une exposition à 50 μ M d'Al et d'un facteur 1.4 chez le cultivar Bounty après une exposition à 5 μ M d'Al.

Pour les gènes impliqués dans la signalisation de l'éthylène, j'ai identifié 7 groupes de gènes : *CTR1*, *HLS1*, *ETR*, Ethylene-response-elongation factor (*EF*), Ubiquitin-system-proteasomique (*USP*), *ERF* et *EIL/EIN* qui sont représentés par un nombre de séquences variant de 3 pour *Ethylene-response EF* jusqu'à 18 séquences pour le groupe des *ERF* (Tableau 4.10). La séquence *Ta.8281.1.S1_at* associée aux *ERF*, et plus spécifiquement à une *EREBP*, et a montré une variation d'expression en fonction de l'Al. L'expression de *Ta.8281.1.S1_at* est augmenté d'un facteur 1.2 chez le cultivar Atlas66 après une exposition à 50 μ M d'Al et d'un facteur 2.6 chez le cultivar Bounty après une exposition à 5 μ M d'Al. Les

gènes sélectionnés plus tôt représentant les gènes *Aco* et *Acs* n'ont montré aucune différence significative d'expression sous exposition à l'Al dans les pointes de racines (Tableau 4.6).

Pour les autres gènes identifiées montrant une induction en réponse à l'Al sur les puces d'ADN, j'ai effectué une analyse bio-informatique similaire à celle utilisée dans la section 4.1, pour dessiner des amorces en suivant les restrictions du qRT-PCR. Pour les 5 autres gènes associés à la synthèse de l'éthylène ou sa signalisation, nous avons élaboré des amorces par bio-informatique (Tableau 3.3 et 4.6).

Les séquences *Ta.28233.1.S1_at*, *Ta.1827.1.S1_x_at*, *Ta.1827.3.A1_a_at*, *Ta.6797.1.A1_at*, *Ta.8281.1.S1_at*, qui sont homologues respectivement à 3 dioxygénases, *SAMd* et à *EREBP*. *Ta.28233.1.S1_at*, *Ta.1827.1.S1_x_at*, *Ta.1827.3.A1_a_at* et *Ta.6797.1.A1_at* ont permis le dessin de 2 paires d'amorces annotées GEN1/GEN1.A, GEN2/GEN2.A, GEN3/GEN3.A et SAM/SAM.A respectivement. *Ta.8281.1.S1_at* n'a permis de dessiner qu'une seule paire d'amorce annotée *EREBP* (Tableau 3.3 et Tableau 4.6). Par contre, les restrictions du qRT-PCR, associées à la nature de ces séquences (trop petites) n'ont pas permis l'élaboration de nouvelles amorces. Les tests sur gel et par la droite dérivée de la courbe de dissociation sur qRT-PCR n'ont pas permis de valider *EREBP*. Les paires amorces GEN1.A, GEN2.A et SAM.A ont été validées par les tests de spécificité et ont montré une efficacité de 99.1 %, 99.5 % et 99.8 % respectivement (Tableau 4.2).

Tableau 4.9 : Inventaire des séquences homologues aux gènes impliqués dans la synthèse de l'éthylène.
Légendes : voir Tableau 3

GÈNE	SEQUENCE ID	RÉFÉRENCES
ACO	Ta.28942.3.SI_x_at; Ta.28942.3.SI_at; Ta.28942.2.AI_at; Ta.28942.1.SI_x_at; Ta.28942.1.SI_at; Ta.28756.3.SI_x_at; Ta.28756.2.SI_x_at; Ta.28756.2.SI_at; TaAffx.100446.1.SI_at; Ta.9107.3.AI_at; Ta.9107.2.SI_at; Ta.9107.2.SI_a_at; Ta.9107.1.SI_x_at	Mekhedov et Kende, 1996
ACS	Ta.24076.1.SI_at; Ta.24341.1.SI_x_at	Subramaniam <i>et al.</i> , 1996
EFE dioxygenase	TaAffx.83820.1.SI_at; Ta.1827.3.AI_a_at ; Ta.1827.2.SI_x_at; Ta.1827.2.SI_at; Ta.1827.1.SI_x_at ; Ta.17821.1.SI_at; Ta.885.1.SI_at; Ta.1745.1.SI_at; Ta.25606.1.AI_at; Ta.22674.2.SI_at; Ta.14248.1.AI_at; Ta.5703.1.SI_x_at; Ta.5703.1.SI_at; Ta.5703.1.SI_a_at; Ta.28233.1.SI_at ; Ta.25967.1.AI_at	AAB88878
SAM décarboxylase	Ta.6797.1.AI_at	CAA73101

Tableau 4.10 Inventaire des séquences homologues aux gènes impliqués dans la signalisation de l'éthylène.
Légendes : voir Tableau 3

GÈNE	SEQUENCE ID	RÉFÉRENCES
<i>CTR1</i>	<i>TaAffx.4129.1.S1_at</i> ; <i>TaAffx.48650.1_at</i> ; <i>TaAffx.83758.1_s_at</i>	Kieber <i>et al.</i> , 1993
<i>HLS1</i>	<i>TaAffx.3070.1.S1_at</i> ; <i>Ta.8379.1.AI_at</i> ; <i>TaAffx.1109.1.S1_at</i> ; <i>TaAffx.58132.1.S1_at</i> ; <i>TaAffx.31719.1.S1_at</i> ; <i>Ta.7430.1.S1_at</i> ; <i>Ta.5268.1.AI_at</i> ; <i>TaAffx.8971.1.S1_at</i> ; <i>TaAffx.86827.1.S1_at</i> ; <i>TaAffx.85009.1.S1_at</i>	Lehman <i>et al.</i> , 1996
<i>ETR</i>	<i>Ta.10139.1.S1_s_at</i> ; <i>Ta.10139.1.S1_at</i> ; <i>TaAffx.110229.1.S1_at</i> ; <i>TaAffx.22824.1.S1_at</i> ; <i>Ta.8619.1.AI_at</i>	Chang <i>et al.</i> , 1993
<i>Ethylene-response EF</i>	<i>Ta.6256.3.S1_a_at</i> ; <i>Ta.6256.1.S1_at</i> ; <i>Ta.454.1.S1_at</i>	Bénichou <i>et al.</i> , 2003
<i>USP</i>	<i>Ta.3320.3.S1_x_at</i> ; <i>Ta.3320.3.S1_a_at</i> ; <i>Ta.3320.2.AI_at</i> ; <i>Ta.3320.1.S1_at</i>	Sauter <i>et al.</i> , 2002
<i>ERF</i>	<i>Ta.27144.3.S1_at</i> ; <i>Ta.27144.3.S1_x_at</i> ; <i>Ta.21098.1.S1_a_at</i> ; <i>Ta.5164.2.S1_at</i> ; <i>TaAffx.128540.1.S1_at</i> ; <i>Ta16395.1.S1_at</i> ; <i>TaAffx.123327.1.S_x_at</i> ; <i>Ta.5164.1.S1_at</i> ; <i>Ta.4470.0.S1_at</i> ; <i>Ta.21098.3.S1_x_at</i> ; <i>Ta.16634.1.S1_x_at</i> ; <i>Ta.5369.1.AI_s_at</i> ; <i>Ta.1136.1.S1_at</i> ; <i>Ta.8281.1.S1_at</i> ; <i>Ta.27936.1.S1_at</i> ; <i>Ta.26781.1.AI_at</i> ; <i>Ta.1593.2.S1_at</i> ; <i>Ta.1593.1.S1_x_at</i>	Buettner et Singh, 1997
<i>EIL/EIN</i>	<i>Ta.11715.1.AI_at</i> ; <i>Ta.9677.1.S1_a_at</i> ; <i>Ta.9677.1.S1_x_at</i> ; <i>Ta.9677.2.S1_at</i> ; <i>Ta.9677.2.S1_x_at</i> ; <i>Ta.9677.3.S1_at</i>	Chao <i>et al.</i> , 1997

L'expression du gène *SAMd* n'a pas montré de différence significative (Fig. 4.10). L'expression des deux *EFE dioxygénases*, ont montré une induction significative entre 2 et 3 fois pour une exposition de 5 et 50 μM d'Al pendant 24 heures pour les cultivars sensibles et tolérants respectivement (Fig. 4.11).

L'induction des *EFE dioxygénases* suggèrent que l'éthylène pourrait être produite en réponse à l'Al par cette voie plutôt que par les gènes *Acs* et *Aco* testés plus tôt dans nos expériences. Cependant les profils d'expression de ces *EFE dioxygénases* montrent qu'il n'y a pas de différence entre les cultivars sensibles et tolérants et sont donc associés à une réponse commune.

L'analyse de la puce à ADN a montré que le gène *Ta.8281.1.S1_at*, associée à un *EREBP*, serait induit uniquement chez le cultivar sensible exposé à l'Al. Chez *Arabidopsis*, la famille des *EREBP* annotées *AtEBP*, est composée par 4 gènes identifiés (*AtEBP1* à 4). L'activation des *AtEBP* est connue pour provoquer l'inhibition de l'élongation cellulaire (Alonso *et al.*, 2003). D'autre part la surexpression de *AtEBP1* a permis d'éliminer la mort cellulaire induite (Ogawa *et al.*, 2005). Suivant ce modèle *EREBP* aurait une fonction inhibitrice de l'élongation cellulaire tout en bloquant l'apparition de la mort cellulaire. L'implication de ce gène supporterait l'hypothèse évoquée par Delisle *et al.*, (2001) évoquant la mort cellulaire comme un moyen de détoxifier les tissus des xénobiotiques chez les cultivars tolérants (en l'occurrence l'Al) puisque la mort cellulaire est inhibée chez le cultivar sensible. Cependant, le profil d'expression de ce gène n'a pu être validé faute d'avoir pu dessiner des amorces spécifiques. Il est donc nécessaire de poursuivre l'analyse de ce gène afin de confirmer les résultats présents par qRT-PCR.

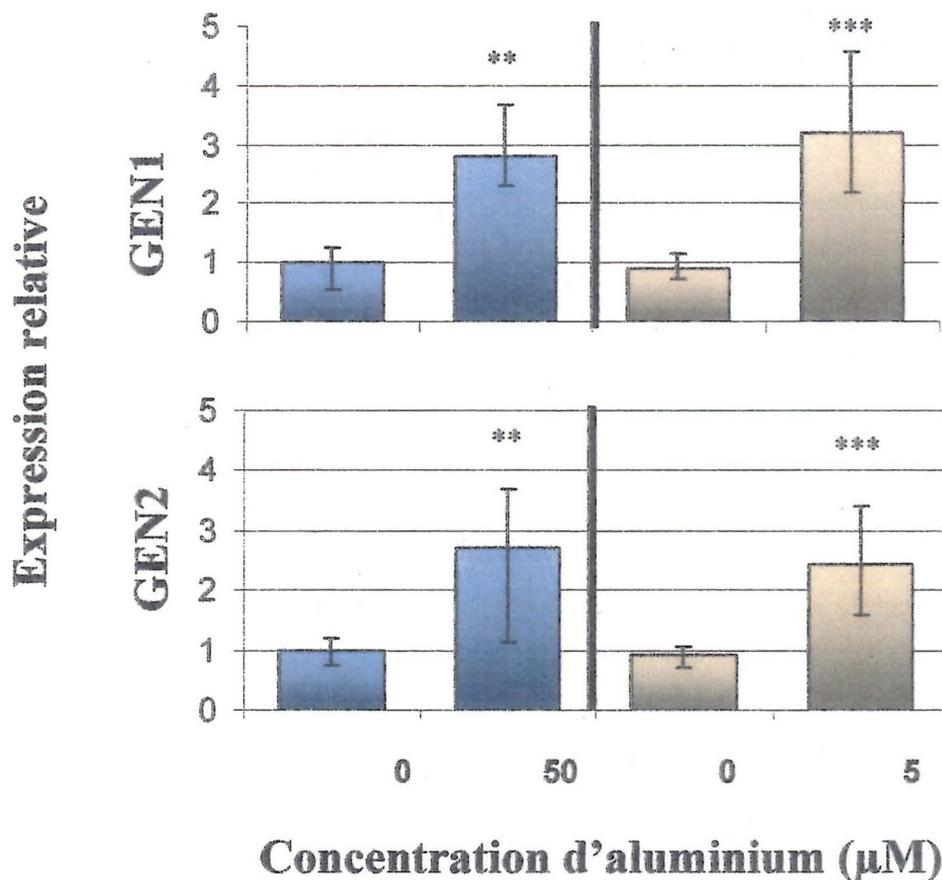


Figure 4.11 : Profil d'expression relative des deux *EFE dioxygénases*, *GEN1* et *GEN2*, par qRT-PCR en fonction de la concentration d'Al pour les cultivars Atlas66 et Bounty exposé à l'Al pendant 24 h.

Les résultats pour les cultivars Atlas66 et Bounty sont représentés par les histogrammes bleus et oranges respectivement. Ces résultats sont exprimés en unité relative au point Atlas66 0 μM qui représente un niveau relatif ajusté à 1. Ils sont tirés des analyses faites par qRT-PCR avec les amorces GEN1.A et GEN2.A (voir Tableau 3.3). Les expériences ont été réalisées en triplicat (***) $P < 0.001$; ** $P < 0.01$; * $P > 0.05$.

4.3 Évaluation de la toxicité de l'Al sur des racines de plantes mutantes d'*Arabidopsis*

L'inhibition du transport de l'auxine par l'Al provoque l'accumulation d'auxine (Hasenstein et Evans, 1988; Kollmeier *et al.*, 2000), et pourrait être responsable de l'inhibition de croissance. Des mutants résistants à l'auxine ont été utilisés pour vérifier si l'arrêt de croissance causé par l'Al pouvait être dû à une accumulation d'auxine ou d'éthylène. Si c'est le cas, les mutants résistants à l'auxine devraient être résistants à l'Al. Les mutants *aux1-7*, *eir1-1*, *tir1-1* et *axr1-3* sont tous résistants à des apports exogènes d'auxine (Bennet *et al.*, 1996; Rahman *et al.*, 2001; Ruegger *et al.*, 1998). À l'exception de *tir1-1*, ils sont aussi tous résistants à l'éthylène (Rahman *et al.*, 2001). Les mutants *aux1-7*, *axr1-3* et *tir1-1* ont montré une aptitude à résister au stress salin (Cao *et al.*, 1993; He *et al.*, 2005). Le mutant *aux1-7* a montré également une capacité à résister à la privation de Fe (Schmidt et Schikora, 2001). Les mutants *aux1-7* et *eir1-1* sont le résultat de l'altération des gènes *AUX1* et *PIN2* reconnus pour être les protéines responsables de l'influx et de l'efflux de l'auxine dans les cellules. Les mutants *tir1-1* et *axr1-3* sont des mutations sur les gènes *TIR1* et *AXR1*, impliqués dans les mécanismes d'activation de l'ubiquitination (Ruegger *et al.*, 1998 ; Leyser *et al.*, 1993). La corrélation des expériences faites à l'aide de ces mutants en fonction de différents stress montre que les voies de réponses aux stress peuvent être activées par les voies associées tant à l'auxine qu'à l'éthylène. Les résultats obtenus, à partir de plusieurs mutants, permettront de déterminer si la sensibilité à l'Al emprunte une de ces voies. Il paraît donc intéressant de mesurer la croissance des racines chez les mutants *aux1-7*, *eir1-1*, *tir1-1* et *axr1-3* exposés à des concentrations inhibitrices d'Al.

On a donc mis au point un milieu de culture adapté à la mesure de pointe de racines d'*Arabidopsis*. Il a été nécessaire de trouver un moyen de mesurer les pointes de racines d'*Arabidopsis* sur milieux solides stériles contenant de l'Al. Nous avons donc combiné les approches méthodologiques de Larsen *et al.* (1996) et le protocole de mesure de pointes de racines sur Pétri (Weigel *et al.*, 2002), pour élaborer ce nouveau modèle de mesure (voir matériels et méthode et Fig. 3.1).

On a effectué des mesures pour des concentrations d'Al dans les milieux de cultures allant de 0 à 150 μM . Les plantules d'*Arabidopsis* ont été étalés à raison de 20-30 par pétri. Des photos des Pétri ont été relevés au jour 4 et 6 de croissance. La superposition des images obtenues a permis de mesurer la croissance entre le jour 4 et le jour 6 à l'aide du logiciel *ImageJ*. Les mesures obtenues ont été normalisées à 100 % pour chaque cultivar d'*Arabidopsis* exposé à 0 μM d'Al série par série. Les données ont été cumulées et ont été analysées par le test ANOVA à l'aide du logiciel *Graph Instat 3*.

La figure 4.12 montre les mesures des pointes de racines pour chaque variété d'*Arabidopsis*. Nous avons constaté que les pointes de racines du contrôle Col0 exposées à 50, 100 et 150 μM ont eu une croissance à 80 %, 55 % et 34 % du témoin sans Al, respectivement. Les résultats sur Col0 ont montré que ce modèle de mesure permettait de suivre l'inhibition de croissance des racines exposées à l'Al sur milieux de culture pour *Arabidopsis*.

Pour *eir1-1*, *tir1-1* et *axr1-3*, on n'a trouvé aucune différence significative dans les ICR en comparaison avec le contrôle Col-0. Pour *aux1-7*, nous avons constaté une différence significative entre les points 0 et 25 μM d'exposition à l'Al. De plus, aucune différence significative n'a pu être montrée entre les points d'exposition à 25, 50, 100 et 150 μM d'exposition. Les résultats ont montré que seul *aux1-7* se comportait différemment de Col0. Cependant *aux1-7* ne fait que montrer une sensibilité précoce dans l'inhibition de croissance puisque son ICR n'est pas significativement différente de Col0 à 100 et 150 μM (Tableau 4.11). Il est à noter que pour 50 % d'ICR les 4 mutants et le témoin ne sont pas significativement différents (Tableau 4.11).

Les propriétés de résistance à l'auxine n'ont donc pas permis aux mutants de résister à l'inhibition de croissance causée par l'Al. Les mécanismes de toxicité de l'Al se distinguent donc de ceux imposés par la privation de Fe, l'ajout exogène en excès de sels, d'éthylène et d'auxine (Cao *et al.*, 1993; He *et al.*, 2005; Schmidt et Schikora, 2001). Les résultats démontrent que l'arrêt de la croissance causée par l'Al n'est pas simplement provoqué par une accumulation d'auxine ou d'éthylène, et que d'autres facteurs sont impliqués.

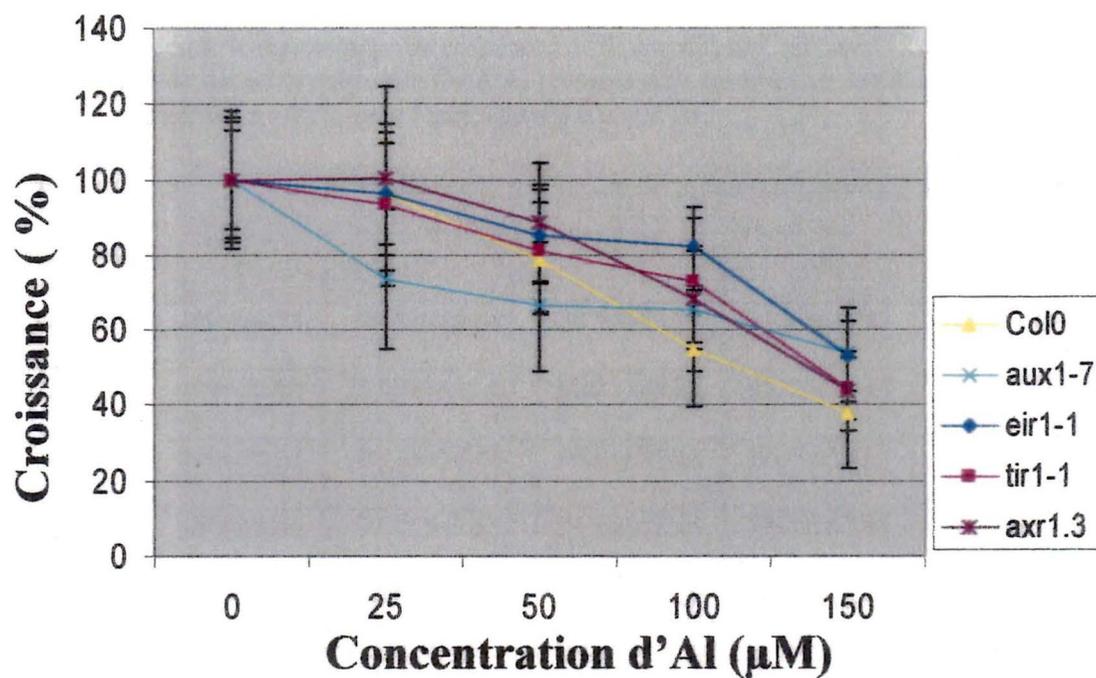


Figure 4.12: Courbes d'inhibition de croissance des mutants d'*Arabidopsis* exposés à différentes concentrations d'Al.

Les points représentent des pourcentages de croissances (indiqués en ordonnée) en fonction de la concentration d'Al (en abscisse) + SE (n>40).

Tableau 4.11 Pourcentage de croissance des racines d'*Arabidopsis* en fonction de la concentration d'aluminium dans les milieux.

Ce tableau donne le pourcentage de croissance + SE (n> 40) de Col0, *aux1-7*, *eir1-1*, *tir1-1* et *axr1-3* en fonction de la concentration d'Al présente dans les milieux de culture. Les valeurs ont été normalisées à 100 % pour l'exposition à 0 μM d'Al.

Nom des lignées	% de croissance en fonction de la concentration d'Al (μM)				
	0	25	50	100	150
Col-0	100±26.54	96.41±26.64	78.91±26.23	55.12±21.23	37.77±19.17
<i>aux1-7</i>	100±36.65	73.6011±32.67	66.27±29.74	65.52±30.73	53.48±28.94
<i>eir1-1</i>	100±33.65	96.25±37.41	85.41±34.14	82.40±33.32	53.08±25.03
<i>tir1-1</i>	100±30.66	93.25±43.56	81.10±32.64	73.09±32.99	44.19±16.51
<i>axr1-3</i>	100±32.94	100.3±48.48	88.51±31.29	68.09±26.26	43.84±20.78

5. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Il est connu que l'Al inhibe le transport de l'auxine dans la zone de transition distale (Hasenstein et Evans, 1998; Kollmeier *et al.*, 2000). Nous avons postulé que l'auxine s'accumulait à dose toxique inhibitrice pour la croissance des racines. Chez un cultivar de blé tolérant à l'Al, la mort cellulaire a été détectée sur les racines exposées à 50 μM d'Al alors que chez un cultivar blé sensible la mort cellulaire n'a pas été détectée sur les racines exposées à 5 μM d'Al causant une même ICR de 50 % (Delisle *et al.*, 2001). Nous avons postulé que la mort cellulaire, induite de manière différente suivant la sensibilité des cultivars à l'Al, était provoquée par la synthèse d'éthylène. Nous avons donc étudié l'expression des gènes de synthèse de l'éthylène sur les pointes de racines de cultivars sensibles et tolérants exposés à l'Al. Enfin, les résultats d'une puce à ADN, nous ont permis d'évaluer l'implication de différentes voies de signalisation et d'induction de l'auxine et de l'éthylène dans les mécanismes de toxicité et de tolérance à l'Al en comparant l'expression de gènes d'intérêt. Pour évaluer la possibilité qu'une dose inhibitrice d'auxine ou d'éthylène pourrait être responsable de l'arrêt de croissance, nous avons testé l'effet de l'Al sur des plantes mutantes d'*Arabidopsis* résistantes aux doses toxiques d'auxine et d'éthylène (Pickett *et al.*, 1990; Rahman *et al.*, 2001).

L'éthylène est impliqué dans la mort cellulaire pour différents stress biotiques et abiotiques. Une augmentation de production de cette hormone est parfois liée à une augmentation d'auxine ou peut être activée indépendamment. Toutefois, cette production est généralement liée à une augmentation de transcription des gènes impliqués dans sa synthèse, soit les gènes de l'ACC synthase (*Acs*) et l'ACC oxydase (*Aco*). Nous n'avons observé aucun changement dans l'expression de ces transcrits chez la variété de blé tolérante à l'Al après 6 heures (avant la mort cellulaire) ou 24 heures d'exposition à l'Al. Par contre une augmentation transitoire d'un facteur 3 a été observé pour le transcrit *Aco* à forte concentration d'Al chez la variété sensible à l'Al. L'analyse par puce d'ADN nous a permis d'identifier deux dioxygénases dont l'expression augmente entre 2 et 3 fois chez les deux cultivars. Ces enzymes sont peu caractérisés mais elles pourraient être impliquées dans une

augmentation de la synthèse de l'éthylène en réponse à l'Al. Une caractérisation détaillée de ces gènes serait nécessaire pour démontrer leur rôle dans la synthèse d'éthylène.

L'analyse par puce d'ADN a également permis d'identifier un transcrite codant pour une *EREBP* (ethylene responsive element binding protein) qui est exprimé plus fortement (2.6 X) chez la variété sensible mais son expression ne varie pas chez la variété tolérante. Une protéine de cette classe a été impliquée comme répresseur de la mort cellulaire. La surexpression d'un tel facteur pourrait expliquer l'absence de mort cellulaire observée à une ICR de 50 % chez le blé sensible. La séquence complète de ce gène devrait être clonée afin de pouvoir poursuivre sa caractérisation.

L'analyse par puce à ADN a permis d'identifier deux gènes homologues de gènes précoces induits en réponse à l'auxine *GH3* et *ARF* suggérant que l'auxine s'accumule chez le blé tout comme chez *Arabidopsis* en réponse à une exposition à l'Al. Malheureusement, les profils d'expression n'ont pu être validés car il n'a pas été possible de concevoir des amorces spécifiques pour le qRT-PCR. Les ARF sont reconnus pour lier des «Auxine Response elements» et pourraient être impliqués dans l'induction de différents gènes associés au stress ou à la tolérance à l'Al. L'identification de gènes associés à la tolérance, tel que la *GST*, suggère que ces gènes pourraient avoir une réponse différente entre les cultivars. La caractérisation du promoteur de ces gènes pourrait permettre de mieux comprendre les mécanismes moléculaires ainsi que les voies de signalisation impliquées.

Sur la base des résultats obtenus concernant la croissance des plantes mutantes d'*Arabidopsis* exposées à l'Al, nous avons conclu que l'inhibition de croissance provoquée par l'Al n'était pas due à l'accumulation toxique d'auxine ou d'éthylène dans les pointes. Les mutants *aux1-7*, *axr1-3*, *eir1-1* et *tir1-1* résistants à l'auxine, n'ont pas montré une croissance améliorée en comparaison du témoin sauvage lorsque les plantes ont été exposées aux effets toxiques de l'Al. Ces mutants auraient eu une meilleure croissance, si l'auxine accumulée, via une dose toxique, provoquait l'inhibition de croissance dans les pointes de racines. Par contre, ces études ne permettent pas de déterminer si une carence en auxine dans certaines régions pourrait être responsable de l'inhibition de croissance causée par l'Al. L'application

exogène d'une auxine lipophile telle le N1-AA à des concentrations différentes permettrait de vérifier cette possibilité. En parallèle, l'analyse de plantes mutantes chez *Arabidopsis* pour les gènes impliqués dans les voies de signalisation de l'éthylène (*etr1*, Gamble *et al.*, 1998 ; *ctr1*, Kieber *et al.*, 1993 ; les knockout de EREBP *EDF*, Alonso *et al.*, 2003; *hls1*, Guzman et Ecker, 1990) pourra être poursuivie afin de comprendre les différences observées dans l'induction de la mort cellulaire par l'Al.

D'une manière plus globale, dans les expériences portant sur les marqueurs moléculaires chez le blé ou pour les mutants d'*Arabidopsis*, il sera possible d'ajouter des inhibiteurs de la synthèse (aminoéthoxyvinyl-glycine (AVG) ; Co^{2+} ,) ou de la signalisation (Ag^+ , 2,5-norbornadiene (NBD)) de l'éthylène afin d'affiner les voies moléculaires associées aux mécanismes de toxicité et de tolérance à l'Al.

6. RÉFÉRENCES

- ABEL, S. et THEOLOGIS, A. 1996. Early genes and auxin action. *Plant Physiol.* **111**: 9-17.
- AHN, S.J., SIVAGURU, M., CHUNG, G.C., RENGEL, Z. et MATSUMOTO, H. 2002. Aluminium-induced growth inhibition is associated with impaired efflux and influx of H⁺ across the plasma membrane in root apices of squash (*Cucurbita pepo*). *J. Exp. Bot.* **53**: 1959-1966.
- AHN, S.J., SIVAGURU, M., OSAWA, H., CHUNG, G.C. et MATSUMOTO, H. 2001. Aluminum inhibits the H⁺-ATPase activity by permanently altering the plasma membrane surface potentials in squash roots. *Plant Physiol.* **126**: 1381-1390.
- ALONSO, J.M. et ECKER, J.R. 2001. The ethylene pathway: a paradigm for plant hormone signalling and interaction. *Sci. STKE.* **re1**.
- ALONSO, J.M., STEPANOVA, A.N., LEISSE, T.J., KIM, C.J., CHEN, H., SHINN, P., STEVENSON, D.K., ZIMMERMAN, J., BARAJAS, P., CHEUK, R., GADRINAB, C., HELLER, C., JESKE, A., KOESEMA, E., MEYERS, C.C., PARKER, H., PREDNIS, L., ANSARI, Y., CHOY, N., DEEN, H., GERALT, M., HAZARI, N., HOM, E., KARNES, M., MULHOLLAND, C., NDUBAKU, R., SCHMIDT, I., GUZMAN, P., AGUILAR-HENONIN, L., SCHMID, M., WEIGEL, D., CARTER, D.E., MARCHAND, T., RISSEEUW, E., BROGDEN, D., ZEKO, A., CROSBY, W.L., BERRY, C.C. et ECKER, J.R. 2003. Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science.* **301**: 653-657
- ALTSCHUL S.F., GISH W., MILLER W., MYERS E.W. et LIPMAN D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**: 403-410
- ALVA, A. K., ASHER C. J. et EDWARDS D. G. 1986. The role of calcium in alleviating aluminium toxicity *Aust. J. Agric. Res.* **37**: 375-382.
- ALVARADO, M.C., ZSIGMOND, L.M., KOVÁCS, I., CSÉPLÖ, A., KONCZ, C. et SZABADOS, L.M. 2004. Gene trapping with firefly luciferase in *Arabidopsis*. Tagging of stress-responsive genes. *Plant Physiol.* **134**: 18-27.
- ANIOL, A.M. 1995. Physiological aspects of aluminum tolerance associated with the long arm of chromosome 2D of the wheat (*Triticum aestivum* L.) genome. *Theor. Appl. Genet.* **91**: 510-516.
- ANIOL, A.M. et GUSTAFLO, J.P. 1984. Chromosome location of genes controlling aluminum tolerance in wheat, rye and triticale. *Can. J. Gen.* **26**: 701-705.

- BATES, P.W. et VIERSTRA, R.D. 1999. UPL1 and 2, two 405 kDa ubiquitin-protein ligases from *Arabidopsis thaliana* related to the HECT-domain protein family. *Plant J.* **20**: 183-195.
- BAULY, J.M., SEALY, I.M., MACDONALD, H., BREARLEY, J., DROGE, S., HILLMER, S., ROBINSON, D.G., VENIS, M.A., BLATT, M.R., LAZARUS, C.M. et NAPIER, R.M. 2000. Overexpression of auxin-binding protein enhances the sensitivity of guard cells to auxin. *Plant Physiol.*, **124**: 1229–1238.
- BENICHO, M., LI, Z., TOURNIER, B., CHAVES, A., ZEGZOUTI, H., JAUNEAU, A., DELALANDE, C., LATCHÉ, A., BOUZAYEN, M., SPREMULLI, L.L. et PECH, J.C. 2003. Tomato EF-Tsmt, a functional mitochondrial translation elongation factor from higher plants *Plant Mol. Biol.* **53**: 411–422.
- BENJAMINS, R., QUINT, A., WEIJERS, D., HOOYKAAS, P. et OFFRINGA, R. 2001. The PINOID protein kinase regulates organ development in *Arabidopsis* by enhancing polar auxin transport. *Development.* **128**: 4057-4067.
- BENNET, M.J., MARCHANT, A., GREEN, H.G., MAY, S.T., WARD, S.P., MILLNER, P.A., WALKER, A.R., SCHULZ, B. et FELDMANN, K.A. 1996. *Arabidopsis* AUX1 gene: a permease-like regulator of root gravitropism. *Science.* **273**: 948-950.
- BERZONSKY, W.A. 1992. The genomic inheritance of aluminum tolerance in 'Atlas66' wheat. *Genome.* **35**: 689-693.
- BLANCAFLOR, E.B., JONES, D. L, et GILROY, S. 1998. Alterations in the cytoskeleton accompany aluminum-induced growth inhibition and morphological changes in primary roots of maize. *Plant Physiol.* **118**: 159-172.
- BLILOU, I., XU, J., WILDWATER, M., PAPONOV, I., FRIML, J. et HEIDSTRA, R. 2005. The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in *Arabidopsis* roots. *Nature.* **433**: 39-44.
- BUETTNER, M. et SINGH, K.B. 1997. *Arabidopsis* ethylene-responsive element binding protein (AtEBP), an ethylene-inducible, GCC box DNA-binding protein interacts with an ocs element binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**: 5961-5966.
- CAMBRIDGE, A. and MORRIS, D. (1996) Transfer of exogenous auxin from the phloem to the polar auxin transport pathway in pea. *Planta.* **199**: 583-588.
- CAO, Y., GLASS, A.D.M. et CRAWFORD, N.M. 1993. Ammonium inhibition of *Arabidopsis* root growth can be reversed by potassium and auxin resistance mutations *aux1*, *axr1* and *axr2*. *Plant Physiol.* **102**: 983-989.
- CARVER, B.J. et OWNY, J.D. 1995. Acid soil tolerance in wheat. *Adv. Agron.* **54**: 117-173.

- CHANG, C., KWOK, S.F., BLEECKER, A.B., et MEYEROWITZ, E.M. 1993. *Arabidopsis* ethylene-response gene ETR1: similarity of product to two-component regulators. *Science*. **262**: 539-543
- CHAO, Q., ROTHENBERG, M., SOLANO, R., ROMAN, G., TERZAGHI, W. et ECKER, J.R. 1997. Activation of the ethylene gas response pathway in *Arabidopsis* by the nuclear protein ETHYLENE-INSENSITIVE3 and related proteins. *Cell*. **89**:1133-1144.
- CHEN, Y.F., RANDLETT, M.D., FINDELL, J.L. et SCHALLER, G.E. 2002. Localization of the ethylene receptor ETR1 to the endoplasmic reticulum of *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.*, **277**: 19861-19866.
- CHRISTENSEN, S.K., DAGENAIS, N., CHORY, J. et WEIGEL, D. 2000. Regulation of auxin response by the protein kinase PINOID. *Cell*. **100**: 469-478.
- CORPET, F. 1988. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucl. Acids Res.* **16**: 10881-10890.
- DAVIES, P.J. 2004. Plant hormones: Biosynthesis, signal transduction, action! *Springer*. pp.750
- DE LA FUENTE, J.M., RAMIREZ-RODRIGUEZ, V., CABRERA-PONCE, J.L. et HERRERA-ESTRELLA, L. 1997. Aluminium tolerance in transgenic plants by alterations of citrate synthesis. *Science*. **276**: 1566-1568.
- DE OLIVIERA CAMARGO, C.E. 2000. Genetic control of aluminium in mutant lines of wheat cultivar Anuhuac. *Euphytica*. **114**: 47-53.
- DE OLIVIERA CAMARGO, C.E. 1981. Melhoramento do trigo. I: Hereditariedade de tolerancia a toxicidade do aluminio. *Bragantia* **40**:33-45.
- DELBARRE, A., MULLER, P. et GUERN, J. 1998. Short-lived and phosphorylated proteins contribute to carrier-mediated efflux, but not to influx, of auxin in suspension cultured tobacco cells. *Plant Physiol*. **116**: 833-844.
- DELBARRE, A., MULLER, P., IMHOFF, V. et GUERN, J. 1996. Comparison of mechanisms controlling uptake and accumulation of 2,4-Dichlorophenoxy acetic acid, Naphthalene-1-acetic acid, and Indole-3-acetic acid in suspension-cultured tobacco cells. *Planta*. **198**: 532-541.
- DELHAIZE, E., CRAIG, S., BEATON, C.D., BENNET, R.J., JAGADISH, V.J. et RANDALL, P.J. 1993. Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.) / I. Uptake and distribution of aluminum in root apices. *Plant Physiol*. **103**: 685-693.

- DELHAIZE, E., HEBB, D.M. et RYAN P.R. 2001. Expression of a *Pseudomonas aeruginosa* citrate synthase gene in tobacco is not associated with either enhanced citrate accumulation or efflux. *Plant Physiol.* **125**: 2059–2067.
- DELHAIZE, E. et RYAN, P.R. 1995. Aluminum toxicity and tolerance in plants. *Plant Physiol.* **107**: 315–321.
- DELHAIZE, E., RYAN, P.R., HEBB, D.M., YAMAMOTO, Y., SASAKI, T. et MATSUMOTO, H. 2004. Engineering high-level aluminum tolerance in barley with the ALMT1 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **101**: 15249–15254.
- DELISLE, G., CHAMPOUX, M. et HOUDE, M. 2001. Characterisation of oxalate oxidase and cell death in Al-sensitive and tolerant wheat roots. *Plant Cell Physiol.* **42**: 324–333.
- ELIASSON, L., BERTELL, G. et BOLANDER, E. 1989. Inhibitory action of auxin on root elongation not mediated by ethylene. *Plant Physiol.* **91**: 310–314.
- EZAKI, B., GARDNER, R.C., EZAKI, Y., KONDO, H. et MATSUMOTO, H. 1998. Protective roles of two aluminum (Al) induced genes, *HSP150* and *SEDI* of *Saccharomyces cerevisiae*, in Al and oxidative stresses. *FEMS Microbiol. Lett.* **159**: 99–105.
- EZAKI B., GARDNER, R.C., EZAKI, Y. et MATSUMOTO, H. 2000. Expression of aluminum-induced genes in transgenic *Arabidopsis* plants can ameliorate aluminum stress and/or oxidative stress. *Plant Physiol.* **122**: 657–665.
- EZAKI, B., KOYANAGI, M., GARDNER, R.C. et MATSUMOTO, H. 1997. Nucleotide sequence of a cDNA for GDP dissociation inhibitor (GDI) which is induced by aluminum (Al) ion stress in tobacco cell culture (accession no. AF012823) (PGR 97–133). *Plant Physiol.* **115**: 314.
- EZAKI, B., TSUGITA, S. et MATSUMOTO H. 1996. Expression of a moderately anionic peroxidase is induced by aluminum treatment in tobacco cells: possible involvement of peroxidase isozymes in aluminum ion stress. *Physiol Plant.* **96**: 21–28
- EZAKI, B., YAMAMOTO, Y. et MATSUMOTO, H. 1995. Cloning and sequencing of the cDNAs induced by aluminum treatment and Pi starvation in tobacco cells. *Physiol. Plant.* **93**: 11–18.
- FISHER, R.A. 1956. Statistical methods and scientific inference. *Oliver & Boyd*. Edinburgh, UK.
- FOY, C.D., CHANEY, R.L., et WHITE, M.C. 1978. The physiology of metal toxicity in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **29**: 511–566.

- FRENSCH, J. 1997. Primary responses of root and leaf elongation to water deficits in the atmosphere and soil solution. *J. Exp. Bot.* **48**: 985-999.
- FRIML, J., BENKOVÁ, E., BLILOU, I., WISNIEWSKA, J., HAMANN, T., LJUNG, K., WOODY, S., SANDBERG, G., SCHERES, B., JÜRGENS, G. et PALME, K. 2002a. AtPIN4 mediates sink-driven auxin gradients and root patterning in *Arabidopsis*. *Cell*. **108**: 661-673.
- FRIML, J., WISNIEWSKA, J., BENKOVA, E., MENDGEN, K. et PALME, K. 2002b. Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in *Arabidopsis*. *Nature*, **415**: 806-809.
- FROVA, C. 2003. The plant glutathione transferase gene family: genomic structure, functions, expression and evolution. *Physiol Plant*. **119**: 469-479.
- FUJIMOTO, S.Y., OHTA, M., USUI, A., SHINSHI, H. et OHME-TAKAGI, M. 2000. *Arabidopsis* ethylene-responsive element binding factors act as transcriptional activators or repressors of GCC box-mediated gene expression. *Plant Cell*. **12**: 393-404.
- GACHON, C., MINGAM, A. et CHARRIER, B. 2004. Real-time PCR: what relevance to plant studies. *J. Exp. Bot.* **55**: 1445-1454.
- GALLEGO, F.J., LOPEZ-SOLANILLA, E., FIGUEIRAS, A.M. et BENITO, C. 1998. Chromosomal location of PCR fragments as a source of DNA markers linked to aluminum genes tolerance in rye. *Theor. Appl. Genet.* **96**: 426-434.
- GALWEILER, L., GUAN, C.H., MULLER, A., WISMAN, E., MENDGEN, K., YEPHREMOV, A. et PALME, K. 1998. Regulation of polar auxin transport by AtPIN1 in *Arabidopsis* vascular tissue. *Science*. **282**: 2226-2230.
- GAMBLE, R.L., COONFIELD, M.L. et SCHALLER, G.E. 1998. Histidine kinase activity of the ETR1 ethylene receptor from *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **95**: 7825-7829.
- GAO, Z., CHEN, Y.F., RANDLETT, M.D., ZHAO, X.C., FINDELL, J.L., KIEBER, J.J. et SCHALLER, G.E. 2003. Localization of the Raf-like kinase CTR1 to the endoplasmic reticulum of *Arabidopsis* through participation in ethylene receptor signaling complexes. *J. Biol. Chem.* **278**: 34725-34732.
- GEE, M.A., HAGEN, G. et GUILFOYLE, T.J. 1991. Tissue-specific and organ-specific expression of soybean auxin-responsive transcripts GH3 and SAURs. *Plant Cell*. **3**: 419-430.
- GELDNER, N., FRIML, J., STIERHOF, Y.D., JURGENS, G., et PALME, K. 2001. Auxin transport inhibitors block PIN1 cycling and vesicle trafficking. *Nature*. **413**: 425-428.

- GILROY, S. et TREWAVAS, A. 2001. Signaling processing and transduction in plant cells: the end of the beginning? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**: 307-314.
- GLADU, N. 1999. Étude de la transmission de signaux impliqués dans la régulation de gènes liés à la toxicité de l'aluminium chez le blé. Mémoire présenté comme exigence partielle de la maîtrise en biologie. Université du Québec à Montréal. pp.96
- GOLDSMITH, M. 1977. The polar transport of auxin. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **28**: 439-478.
- GUO, H. et ECKER, J.R. 2004. The ethylene signaling pathway: new insights. *Curr. Opin. Plant Biol.* **7**: 40-49.
- GUO, H. et ECKER, J.R. 2003. Plant responses to ethylene gas are mediated by SCF (EBF1/EBF2)-dependent proteolysis of EIN3 transcription factor. *Cell.* **115**: 667-677.
- GUZMAN, P. et ECKER, J.R. 1990. Exploiting the triple response of Arabidopsis to identify ethylene-related mutants. *Plant Cell* **2**: 513-23.
- HAGER, A. 2003. Role of the plasma membrane H⁺-ATPase in auxin-induced elongation growth: historical and new aspects. *J. Plant. Res.* **116**: 483-505.
- HAMEL, F., BRETON, G. et HOUDE, M. 1998. Isolation and characterisation of wheat aluminum-regulated genes: possible involvement of aluminum as pathogenesis response elicitor. *Planta.* **205**: 531-538.
- HAMMOND-KOSACK K.E. et JONES J.D. 1996. Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell.* **8**: 1773-1791.
- HASENSTEIN, K.H. et EVANS, M.L. 1988. Effects of cations on hormone transport in primary roots of *Zea mays*. *Plant Physiol.* **86**: 890-894.
- HAUG, A. 1984. Molecular aspects of aluminum toxicity. *Crit. Rev. Plant Sci.* **1**: 345-373.
- HAUG, A., SHI, B. et VITORELLO, V. 1994. Aluminum interaction with phosphoinositide-associated signal transduction. *Arch. Toxicol.* **68**: 1-7.
- HE, C.J., MORGAN, P.W. et DREW, M.C. 1996. Transduction of an ethylene signal is required for cell death and lysis in the root cortex of maize during aerenchyma formation induced by hypoxia. *Plant Physiol.* **112**: 463-472
- HE, X.J., MU, R.L., CAO, W.H., ZHANG, Z.G., ZHANG, J.S. et CHEN, S.Y. 2005. AtNAC2, a transcription factor downstream of ethylene and auxin signaling pathways, is involved in salt stress response and lateral root development. *Plant J.* **44**: 903-916.

- HELPER, P.K. et WAYNE, R.W. (1985) Calcium and plant development. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **36**: 397-436.
- HIGGINS, C.F. 1992. ABC transporters: From microorganisms to man. *Annu. Rev. Cell Biol.* **8**: 67-113.
- HOEKENGA, Q.A., VISION, T.J., SHAFF, J.E., MONFORTE, A.J., LEE, G.P., HOWELL, S.H. et KOCHIAN, L.A. 2003. Identification and characterization of aluminum tolerance loci in *Arabidopsis* (Landsberg *erecta* x Columbia) by quantitative trait locus mapping. A physiologically simple but genetically complex trait. *Plant Physiol.* **132**: 936-948
- HOUDE, M. et IGUILIZ. 2007. Genome wide expression profiling identifies several genes associated with aluminum tolerance. *BMC Genomics*. Submitted.
- HUANG, J.W., PELLET, D.M., PAPERNIK, L.A. et KOCHIAN, L.V. 1996. Aluminum interactions with voltage-dependent calcium transport in plasma membrane vesicles isolated from roots of aluminum-sensitive and aluminum-tolerant wheat cultivars. *Plant Physiol.* **110**: 561-569.
- HUANG, J.W., SHAFF, J.E., GRUNES, D.L. et KOCHIAN, L.V. 1992. Aluminum effects on calcium fluxes at the root apex of aluminum-tolerant and aluminum-sensitive wheat cultivars. *Plant Physiol.* **98**: 230-237.
- HUANG, Y., LI, H., HUTCHISON, C.E., LASKEY, J. et KIEBER, J.J. 2003. Biochemical and functional analysis of CTR1, a protein kinase that negatively regulates ethylene signalling in *Arabidopsis*. *Plant J.* **33**: 221-33.
- INTERNATIONAL RICE GENOME SEQUENCING PROJECT. 2005. The map-based sequence of the rice genome. *Nature.* **436**: 793-800.
- IRIZARRY, R.A., HOBBS, B., COLLIN, F., BEAZER-BARCLAY, Y.D., ANTONELLIS, K.J., SCHERF, U. et SPEED, T.P. 2003. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics.* **4**: 249-264.
- ISHIKAWA, H. et EVANS, M.L. 1993. The role of the distal elongation zone in the response of maize roots to auxin and gravity. *Plant Physiol.* **102**: 1203-1210.
- ISHIKAWA, S., WATSUMA, T., SAZAKI, R. et OFEI-MANU, P. 2000. Comparison of the amount of citric and malic acids in Al media of seven plant species and two cultivars each in five plants. *Soil Sci. Plant Nutr.* **46**: 751-758.
- ITO, H. et GRAY, W.M. 2006. A gain-of-function mutation in the *Arabidopsis* pleiotropic drug resistance transporter PDR9 Confers Resistance to auxinic herbicides. *Plant Physiol.* **142**: 63-74.

- JACOBS, M. et RUBERY, P.H. 1988. Naturally occurring auxin transport regulators. *Science*. **241**: 346-349.
- JONES, A.M. 1998. Auxin transport: down and out and up again. *Science*. **282**: 2201-2203.
- JONES, D.L., GILROY, S., LARSEN, P.B., HOWELL, S.H. et KOCHIAN, L.V. 1998a. Effects of aluminum on cytosolic Ca^{2+} homeostasis in root hairs of *Arabidopsis thaliana* L. *Planta* **206**: 378-387.
- JONES, D.L. et KOCHIAN, L.V. 1995. Aluminium inhibition of the inositol 1,4,5-triphosphate signal transduction pathway in wheat root : a role in aluminium toxicity? *Plant Cell*. **7**: 1913-1922.
- JONES, D.L., KOCHIAN, L.V. et GILROY, S. 1998b. Aluminum induces a decrease in cytosolic calcium concentration in BY-2 tobacco cell cultures. *Plant Physiol*. **116**: 81-89.
- JOO, J.H., BAE, Y.U. et LEE, J.S. 2001. Role of auxin-induced reactive oxygen species in root gravitropism. *Plant Physiol*. **126**: 1055-1060
- KANG, B.G., NEWCOMB, W. et BURG, S.P. 1971. Mechanism of auxin-induced ethylene production. *Plant Physiol*. **47**: 504-509.
- KERK, N.M. et FELDMAN, L.J. 1995. A biochemical model for the initiation and maintenance of the quiescent center: implications for the organisation of root meristems. *Development*. **121**: 2825-2833.
- KERK, N.M., JIANG, K. et FELDMAN, L.J. 2000. Auxin metabolism in the root apical meristem. *Plant Physiol.*, **122**: 925-932.
- KIEBER, J.J., ROTHENBERG, M., ROMAN, G., FELDMANN, K.A. et ECKER, J.R. 1993. CTR1, a negative regulator of the ethylene response pathway in *Arabidopsis*, encodes a member of the raf family of protein kinases. *Cell*, **72**: 427-41.
- KIM, Y.S., CHOI, D., LEE, M.M., LEE, S.H. et KIM, W.T. 1998. Biotic and abiotic stress-related expression of 1-Aminocyclopropane-l-carboxylate oxidase gene family in *nicotiana glutinosa* L. *Plant and Cell Physiol*. **39**: 565-573
- KINRAIDE, T.B. 1998. Three mechanisms for the calcium alleviation of mineral toxicities *Plant Physiol*. **118**: 513-520.
- KINRAIDE, T.B. 1994. Use of a Gouy-Chapman-Stern model for membrane-surface electrical potential to interpret some features of mineral rhizotoxicity. *Plant Physiol*. **106**: 1583-1592.
- KINRAIDE, T.B. 1991. Identity of the rhizotoxic aluminium species. *Plant Soil*. **134**: 167-178.

- KINRAIDE, T.B. et PARKER, D.R. 1990. Apparent phytotoxicity of mononuclear hydroxy-aluminum to four dicotyledonous species. *Physiol. Plant.* **79**: 283-288
- KINRAIDE, T.B. et PARKER, D.R. 1987. Apparent phytotoxicity of mononuclear hydroxyaluminum. *Plant Cell. Environ.* **12**: 479-487.
- KINRAIDE, T.B., RYAN, P.R. et KOCHIAN, L.V. 1992. Interactive effects of Al^{3+} , H^+ , and other cations on root elongation considered in terms of cell-surface electrical potential. *Plant Physiol.* **99**: 1461-1468.
- KOBAYASHI, Y. et KOYAMA, H. 2002 QTL analysis of Al tolerance in recombinant inbred lines of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* **43**: 1526-1533
- KOCHIAN, L.V. 1995. Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **46**: 237-260.
- KOLLMEIER, M., FELLE, H.H. et HORST, W.J. 2000. Genotypical differences in aluminium resistance of maize are expressed in the distal part of the transition zone. Is reduced basipetal auxin flow involved in inhibition of root elongation by aluminium? *Plant Physiol.* **122**: 945-956.
- LAMMER D, MATHIAS N, LAPLAZA JM, JIANG W, LIU Y, CALLIS J, GOEBL M, et ESTELLE, M. 1998. Modification of yeast Cdc53p by the ubiquitin-related protein Rub1p affects function of the SCFCdc4 complex. *Genes Dev.* **12**: 914-926.
- LARSEN, P.B., DEGENHARDT, J., TAI, C.-J., STENZLER, L.M., HOWELL, S.H. et KOCHIAN, L.V. 1998. Aluminum-resistant *Arabidopsis* mutants that exhibit altered patterns of aluminum accumulation and organic acid release from roots. *Plant Physiol.* **117**: 9-18.
- LARSEN, P.B., GEISLER, M.J., WILLIAMS, K.M. et CANCEL, J.D. 2005. ALS3 encodes a phloem-localized ABC transporter-like protein that is required for aluminum tolerance in *Arabidopsis*. *Plant J.* **41**: 353-63.
- LARSEN, P.B., TAI C.-J., KOCHIAN, L.V. et HOWELL, S.H. 1996. *Arabidopsis* mutants with increased sensitivity to aluminum. *Plant Physiol.* **110**: 743-751.
- LEE, T.M. et LIN, Y.H. 1996. Peroxidase activity in ethylene-, ABA-, or MeJA-treated rice (*Oryza sativa L.*) roots. *Bot. Bull. Acad. Sin.* **37**: 201-207.
- LEHMAN, A., BLACK, R. et ECKER, J.R. 1996. HOOKLESS1, an ethylene response gene, is required for differential cell elongation in the *Arabidopsis* hypocotyl. *Cell.* **85**: 183-194.

- LEYSER, O. 2002. Molecular genetics of auxin signaling. *Annu Rev. Plant Biol.* **53**: 377-398.
- LEYSER, O., LINCOLN, C.A., TIMPTE, C., LAMMER, D., TURNER, J. et ESTELLE, M. 1993. *Arabidopsis* auxin-resistance gene AXRL encodes a protein related to ubiquitin-activating enzyme E1. *Nature.* **364**: 161.
- LI, J., DAI, X. et ZHAO, Y. 2006. A Role for auxin response factor 19 in auxin and ethylene signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **140**: 899-908.
- LINCOLN, C., BRITTON, J., et ESTELLE, M. 1990. Growth and development of the axrl mutants of *Arabidopsis*. *Plant Cell.* **2**: 1071-1080.
- LINDBERG, S. et STRID, H. 1997. Aluminium induces rapid changes in cytosolic pH and free calcium and potassium concentration in root protoplasts of wheat (*Triticum aestivum*). *Physiol. Plant.* **99**: 405-414.
- LISCUM, E. et REED, J.W. 2002. Genetics of AUX/IAA and ARF action in plant growth and development. *Plant Mol. Biol.* **49**: 387-400.
- LIU, X. et LUAN, S. 2001. Internal aluminum block plant inward K⁺ channels. *Plant Cell.* **13**: 1453-1465.
- LIU, Y. et ZHANG, S. 2004. Phosphorylation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase by MPK6, a stress-responsive mitogen-activated protein kinase, induces ethylene biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* **16**: 3386-3399.
- LJUNG, K., HULL, A.K., KOWALCZYK, M., MARCHANT, A., CELENZA, J., COHEN, J.D. et SANDBERG, G. 2002. Biosynthesis, conjugation, catabolism and homeostasis of indole-3-acetic acid in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* **49**: 249-272.
- LOMAX, T., MUDAY, G. et RUBERY, P. 1995. Auxin transport. In: *Plant hormones, Physiology, Biochemistry and Molecular Biology.* (Davies, P.J., ed.). 509-530.
- LU, Y.P., LI, Z.S. et REA, P.A. 1997. AtMRP1 gene of *Arabidopsis* encodes a glutathione S-conjugate pump: isolation and functional definition of a plant ATP-binding cassette transporter gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **94**: 8243-8248
- LUSCHNIG, C., GAXIOLA ROBERTO, A., GRISAFI, P. et FINK GERALD, R. 1998. EIR1, a rootspecific protein involved in auxin transport, is required for gravitropism in *Arabidopsis thaliana*. *Genes. Dev.*, **12**: 2175-2187.
- MA, J.F. 2000. Role of acids in detoxification in higher plants. *Plant Cell Physiol.* **41**: 383-390.

- MA, Z. et MIYASAKA, S.C. 1998. Oxalate exudation by taro in response to Al. *Plant Physiol.* **118**: 861-865.
- MA, J.F., ZHENG, S.J. et MATSUMOTO, H. 1997a. Specific secretion of citric acid induced by Al stress in *Cassia tora* L. *Plant Cell Physiol.* **38**: 1019-1025.
- MA, J.F., ZHENG, S.J., MATSUMOTO, H. et HIRADATE, S. 1997b. Detoxifying aluminum with buckwheat. *Nature.* **390**: 569-570.
- MALTAIS, K. 2002. Identification d'un marqueur de tolérance chez le blé *Triticum aestivum* et manipulations visant à évaluer la rôle de l'auxine dans la toxicité à ce métal. Mémoire présenté comme exigence partielle de la maîtrise en biologie. Université du Québec à Montréal. pp.89
- MALTAIS, K. et HOUDE, M. 2002. A new biochemical marker for aluminum tolerance in plants. *Physiol. Plant.* **115**: 81-86.
- MAO, C., Yi, K., YANG, L., ZHENG, B., WU, Y., LIU, F. et WU, P. 2004. Identification of aluminium-regulated genes by cDNAFLP in rice (*Oryza sativa* L.): aluminium-regulated genes for the metabolism of cell wall components. *J. Exp. Bot.* **55**: 137-143.
- MARCHANT, A., KARGUL, J., MAY SEAN, T., MULLER, P., DELBARRE, A., PERROT-RECHENMANN, C. et BENNET MALCOLM, J. 1999. AUX1 regulates root gravitropism in *Arabidopsis* by facilitating auxin uptake within root apical tissues. *EMBO J.* **18**: 2066-2073.
- MCDONALD, T.L., HUMPHREYS, W.G. et MARTIN, R.B. 1987. Promotion of tubulin assembly by aluminum ion in vitro. *Science.* **236**: 183-186.
- MCDONALD, T.L. et MARTIN, R.B. 1988. Aluminum ion in biological systems. *Trends Biochem. Sci.* **13**: 15-19.
- MEKHEDOV, S.L. et KENDE, H. 1996. Submergence enhances expression of a gene encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase in deepwater rice. *Plant Cell Physiol.* **37**: 531-537.
- MIZUNO, H., KOBAYASHI, A., FUJII, N., YAMASHITA, M. et TAKAHASHI, H. 2002. Hydrotropic Response and Expression Pattern of Auxin-Inducible Gene, CS-IAA1, in the Primary Roots of Clinorotated Cucumber Seedlings. *Plant Cell Physiol.* **116**: 483-505.
- MORRIS, D.A. et ROBINSON, J.S. 1998. Targeting of auxin carriers to the plasma membrane - differential effects of brefeldin A on the traffic of auxin uptake and efflux carriers. *Planta.* **205**: 606-612.

- MORRIS, D.A., RUBERY, P.H., JARMAN, J. et SABATER, M. 1991. Effects of inhibitors of protein synthesis on transmembrane auxin transport in *Cucurbita pepo* L. hypocotyl segments. *J. Exp. Bot.* **42**: 773-784.
- MUDAY, G. 2000. Maintenance of asymmetric cellular localization of an auxin transport protein through interaction with the actin cytoskeleton. *J. Plant Growth Regul.* **19**: 385-396.
- MULLER, A., GUAN, C., GALWEILER, L., TANZLER, P., HUIJSER, P., MARCHANT, A., PARRY, G., BENNET, M., WISMAN, E. et PALME, K. 1998. AtPIN2 defines a locus of *Arabidopsis* for root gravitropism control. *EMBO J.* **17**: 6903-6911.
- MUDAY, G. et MURPHY. 2002. An emerging model of auxin transport regulation. *Plant Cell.* **14**: 293-299.
- MURPHY A.S., HOOGNER, K.R., PEER, W.A. et TAIZ, L. 2001. Identification, purification, and molecular cloning of N-1-Naphthylphthalamic acid-binding plasma membrane-associated aminopeptidases from *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **128**: 935-950.
- NAPIER, R.M., DAVID, K.M., PERROT-RECHENMANN, C. 2002. A short history of auxin-binding proteins. *Plant Mol. Biol.* **49**: 339-348.
- NGUYEN, V.T., NGUYEN, B.D., SARKARUNG, S., MARTINEZ, C., PATERSON, A.H., 2002. Mapping of genes controlling aluminum tolerance in rice: comparison of different genetic backgrounds. *Mol. Genet. Genomics.* **267**: 772-780.
- NOH, B., MURPHY, A.S., et SPALDING, E.P. 2001. Multidrug resistance-like genes of *Arabidopsis* required for auxin transport and auxin-mediated development. *Plant Cell.* **13**: 2441-2454.
- OGAWA, T., PAN, L., KAWAI-YAMADA, M., YU, L-H., YAMAMURA, S., KOYAMA, T., KITAJIMA, S., OHME-TAKAGI, M., SATO, F. et UCHIMIYA, H. 2005. Functional analysis of *Arabidopsis* ethylene-responsive element binding protein conferring resistance to bax and abiotic stress-induced plant cell death. *Plant Physiol.* **138**: 1436-1445.
- OLSON, D.C., OETIKER, J.H. et YANG, S.F. 1995. Analysis of LE-ACS3, an ACC synthase gene expressed during flooding in the roots of tomato plants. *J. Biol. Chem.* **270**: 14056-14061.
- OTTENSCHLAGER, I. 2002. Gravity regulated differential auxin transport in *Arabidopsis* roots and the search for interaction partners of AtPIN1. Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln. Köln. pp.107

- OUAKED, F., ROZHON, W., LECOURIEUX, D. et HIRT, H. 2003. A MAPK pathway mediates ethylene signaling in plants. *EMBO J.*, **22**: 1282-8.
- OVERVOORDE, P.J., OKUSHIMA, C., OUACH, H., SMITH, A., YU, G. et THEOLOGIS, A. 2005. Functional genomic analysis of the AUXIN/INDOLE-3-ACETIC ACID gene family members in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*. **17**: 3282-3300.
- PALME, K. et GALWEILER, L. 1999. PIN-pointing the molecular basis of auxin transport. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2**: 375-381.
- PARRY, G., DELBARRE, A., MARCHANT, A., SWARUP, R., NAPIER, R., PERROT-RECHENMANN, C. et BENNETT, M.J. 2001. Novel auxin transport inhibitors phenocopy the auxin influx carrier mutation *aux1*. *Plant J.* **25**: 399-406.
- PELLET, D.M., GRUNES, D.L. et KOCHIAN, L.V. 1995. Organic acid exudation as an aluminum-tolerance mechanism in maize (*Zea mays* L.). *Planta*. **196**: 788-795.
- PICKETT, F. B., WILSON, A.K., ESTELLE, M. 1990. The *aux1* mutation of *Arabidopsis* confers both auxin and ethylene resistance. *Plant Physiol.* **94**: 1462-1466.
- RAHMAN, A., AMAKAWA, T., GOTO, N. et TSURUMI, S. 2001. Auxin is a positive regulator for ethylene-mediated response in the growth of *Arabidopsis* roots. *Plant Cell Physiol.* **42**: 301-307.
- RASHOTTE, A.M., BRADY, S.R., REED, R.C., ANTE, S.J. et MUDAY, G.K. 2000. Basipetal auxin transport is required for gravitropism in roots of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **122**: 481-490.
- RENGEL, Z. et ELIOT, D. 1992. Mechanism of aluminum on net $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake by *Amarantus* protoplasts. *Plant Physiol.* **98**: 632-638.
- RICHARDS, K.D., SCHOTT, E.J., SHARMA, Y.K., DAVIS, K.R., et GARDNER, R.C. 1998. Aluminum induces oxidative stress genes in *Arabidopsis thaliana* L. *Plant Physiol.* **116**: 409-441.
- RIECHMANN, J.L. et MEYEROWITZ, E.M. 1998. The AP2/EREBP family of plant transcription factors. *J. Biol. Chem.* **379**: 633-646.
- ROMAN, G., LUBARSKY, B., KIEBER, J.J., ROTHENBERG, M. et ECKER, J.R. 1995. Genetic analysis of ethylene signal transduction in *Arabidopsis thaliana*: five novel mutant loci integrated into a stress response pathway. *Genetics*. **139**: 1393-1409.
- ROZEN, S. et SKALETSKY, H.J. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp 365-386.

- RUBERY, P.H. 1990. Phytotropins: receptors and endogenous ligands. Symp. Soc. Exp. Biol. **44**: 119-146.
- RUBERY, P.H. et SHELDRAKE, A.R. (1974) Carrier mediated auxin transport. *Planta*. **118**: 101-121.
- RUEGGER M, DEWEY E, GRAY WM, HOBBIE L, TURNER J, et ESTELLE, M. 1998. The TIR1 protein of *Arabidopsis* functions in auxin response and is related to human SKP2 and yeast Grr1p. *Genes Dev.* **12**: 198-207.
- RYAN, P.R., DELHAIZE, E. et RANDALL, P.J. 1995. Characterisation of Al-stimulated efflux of malate from the apices of tolerant wheat roots. *Planta*. **196**: 103-107.
- RYAN, P.R., DITOMASO, J.M. et KOCHIAN, L.V. 1993. Aluminum toxicity in roots: an investigation of spatial sensitivity and the role of the root cap. *J. Exp. Bot.* **259**: 437-446.
- RYAN, P.R. et KOCHIAN, L.V. 1993. Interaction between aluminum toxicity and calcium uptake at the root apex in near-isogenic lines of wheat (*Triticum aestivum* L.) differing in aluminum tolerance. *Plant Physiol.* **102**: 975-982.
- RYAN, P.R., SHAFF, J.E. et KOCHIAN, L.V. 1992. Aluminum toxicity in roots. Correlation among ionic currents, ion fluxes, and root elongation in aluminum-sensitive and aluminum-tolerant wheat cultivars. *Plant Physiol.* **99**: 1193-1200.
- SALINAS, A.E. et WONG, M.G. 1999. Glutathione S-transferases : a review. *Curr. Med. Chem.* **6**: 279-309.
- SASAKI, T, EZAKI, B. et MATSUMOTO, H. 2002. A gene encoding multidrug resistance (MDR)-like protein is induced by aluminum and inhibition of calcium flux in wheat. *Plant Cell Physiol.* **43**: 177-185
- SASAKI, T., YAMAMOTO, Y., EZAKI, B., KATSUHARA, M., AHN, S.J., RYAN, P.R., DELHAIZE, E. et MATSUMOTO, H. 2004. A wheat gene encoding an aluminum-activated malate transporter. *Plant J.* **37**: 645-653.
- SASAKI, M., YAMAMOTO, Y. et MATSUMOTO, H. 1996. Lignin deposition induced by aluminum in wheat (*Triticum aestivum*) roots. *Physiol. Plant.* **96**: 193-198.
- SAUTER, M., RZEWUSKI, G., MARWEDEL, T. et LORBIECKE, R. 2002. The novel ethylene-regulated gene OsUsp1 from rice encodes a member of a plant protein family related to prokaryotic universal stress proteins. *J. Exp. Bot.* **53**: 2325-2331.
- SCHERER, G.F.E. 2002. Secondary messengers and phospholipase A2 in auxin signal transduction. *Plant Mol. Biol.* **49**: 357-372.

- SCHMIDT, R., BOHM, K., VATER, W. et UNGER, E. 1991. Aluminium induced osteomalacia and encephalopathy : an aberration of the tubulin assembly into microtubules (MTs) by Al³⁺? Prog. Histochem. Cytochem. **23**: 355-364.
- SCHMIDT, W. et SCHIKORA, A. 2001. Different pathways are involved in phosphate and iron stress-induced alterations of root epidermal cell development. Plant Physiol. **125**: 2078-2084.
- SILVA, I.R., SMYTH, T.J., MOXLEY, D.F., CARTER, T.E., ALLEN, N.S. et RUFTY, T.W. 2000. Aluminum accumulation at nuclei cells in the root-tip. Fluorescence detection using lumogallion and cofocal laser scanning microscopy. Plant Physiol. **123**: 543-552.
- SINGER, S.M., CHAMBERS, C.B., NEWFRY, G.A., NORLUND, M.A. et MUMA, N.A. 1997. Tau in aluminum-induced neurofibrillary tangles. Neurotoxicology **18**: 63-76.
- SIVAGURU, M., EZAKI, B., HE, Z.H, TONG, H., OSAWA, H., BALUSKA, F., VOLKMANN, D. et Matsumoto, H. 2003. Aluminum induced gene expression and protein localization of a cell wall-associated receptor protein kinase in *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiol. **132**: 2256-2266.
- SIVAGURU, M. et HORST, W.J. 1998. The distal part of the transition zone is the most aluminium sensitive apical root zone of maize. Plant Physiol. **116**: 155-163.
- SMITH, A.P., NOURIZADEH, S.D. PEER, W.A., XU, J., BANDYOPADHYAY, A., MURPHY, A.S. et GOLDSBROUGH, P.B. 2003. *Arabidopsis* AtGSTF2 is regulated by ethylene and auxin, and encodes a glutathione S-transferase that interacts with flavonoids.
Plant J. **36**: 433-442.
- SNOWDEN, K.C. et GARDNER, R.C. 1993. Five genes induced by aluminium in wheat (*Triticum aestivum*) roots. Plant Physiol. **103**: 855-863.
- SNOWDEN, K.C., RICHARDS, K.D. et GARDNER, R.C. 1995. Aluminum induced genes. Induction by toxic metals, low Ca and wounding, and pattern of expression in root tips. Plant Physiol. **107**: 341-347.
- SOLANO, R., STEPANOVA, A., CHAO, Q. et ECKER, J.R. 1998. Nuclear events in ethylene signaling: a transcriptional cascade mediated by ETHYLENE-INSENSITIVE3 and ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1. Genes. Dev. **12**: 3703-3714.
- STASWICK, P.E., TIRYAKI, I. et ROWE, M.L. 2002. Jasmonate response locus JAR1 and several related *Arabidopsis* genes encode enzymes of the firefly luciferase superfamily that show activity on jasmonic, salicylic, and indole-3-acetic acids in an assay for adenylation. Plant Cell. **14**: 1405-1415.

- STEINMANN, T., GELDNER, N., GREBE, M., MANGOLD, S., JACKSON, C.L., PARIS, S., GALWEILER, L., PALME, K. et JURGENS, G. 1999. Coordinated polar localization of auxin efflux carrier PIN1 by GNOM ARF GEF. *Science*. **286**: 316-318.
- STEPANOVA, A.N. et ECKER, J.R. 2000. Ethylene signalling: From mutants to molecules. *Curr. Opin. Plant Biol.* **3**: 353-360.
- STRONG, M.J., GARRUTO, R.M., JOSHI, J.G., MUNDY, W.R. et SHAFER, T.J. 1997. Can the mechanisms of aluminum neurotoxicity be integrated into a single unified scheme? In RA Yokel, MS Golub, eds, *Research Issues in Aluminum Toxicity*. Taylor and Francis, Washington, DC, pp 207-239.
- SUBRAMANIAM K., ABBO, S. et UENG, P.P. 1996. Isolation of two differentially expressed wheat ACC synthase cDNAs and the characterization of one of their genes with root-predominant expression. *Plant Mol. Biol.* **31**: 1009-1010
- SWARUP, R., FRILM, J., MARCHANT, A., LJUNG, K., SANDBERG, G., PALME, K. et BENNETT, M. (2001). Localization of the auxin permease AUX1 suggests two functionally distinct hormone transport pathways operate in the *Arabidopsis* root apex. *Genes Dev.* **15**: 2648-2653.
- TAKAHASHI, Y. et NAGATA, T. 1992. *parB*: an auxin-related gene encoding glutathione S-transferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**: 56-59.
- TAO, L., CHEUNG, A.L. et WU, H. 2002. Plant rac-like GTPases are activated by auxin and mediate auxin-response gene expression. *Plant Cell.* **14**: 2745-2760.
- TAYLOR, G.J. 1995. Overcoming barriers to understanding the cellular basis of aluminium resistance. *Plant Soils.* **171**: 89-103.
- TAYLOR, G.J. 1988. The physiology of aluminium phytotoxicity, *Dans H. Sigels, eds Metal ions in biologicals systems*, vol.24. Marcel Dekker, New York, pp. 123-163.
- THEOLOGIS, A. 1992. One rotten apple spoils the whole bushel: the role of ethylene in fruit ripening. *Cell.* **70**: 181-184.
- THEOLOGIS, A. 1986. Rapid gene regulation by auxin. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **37**: 407-438.
- TIEMAN, D.M., TAYLOR, M.G., CIARDI, J.A. et KLEE, H.J. 2000. The tomato ethylene receptors NR and LeETR4 are negative regulators of ethylene response and exhibit functional compensation within a multigene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**: 5663-5668.

- TIMMERMAN, K.P. 1989. Molecular characterization of corn glutathione *S*-transferase isozymes involved in herbicide detoxification. *Physiol. Plant.* **77**: 465-471.
- TURNER, J.G., ELLIS, C. et DEVOTO, A. 2002. The jasmonate signal pathway. *Plant Cell.* **14**: S153-S164.
- ULMASOV, T., HAGEN, G. et GUILFOYLE, T. J. 1999. Activation and repression of transcription by auxin-response factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96**: 5844-5849.
- VERELST, W., KAPILA, J., DE ALMEIDA ENGLER, J., STONE, J.M., CAUBERGS, R. et ASARD, H. 2004. Tissue-specific expression and developmental regulation of cytochrome *b561* genes in *Arabidopsis thaliana* and *Raphanus sativus*. *Physiol. Plant.* **120**: 312-318.
- VOGEL, J.P., WOESTE, K.E., THEOLOGIS, A. et KIEBER, J.J. 1998. Recessive and dominant mutations in the ethylene biosynthetic gene ACS5 of *Arabidopsis* confer cytokinin insensitivity and ethylene overproduction, respectively. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**: 4766-4771.
- WANG, N.N., SHIH, M.C. et LI, N. 2005. The GUS reporter-aided analysis of the promoter activities of *Arabidopsis* ACC synthase genes AtACS4, AtACS5, and AtACS7 induced by hormones and stresses. *J. Exp. Bot.* **56**: 909-920.
- WANG, W., HALL, A.E., O'MALLEY, R. et BLEECKER, A.B. 2003. Canonical histidine kinase activity of the transmitter domain of the ETR1 ethylene receptor from *Arabidopsis* is not required for signal transmission. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **100**: 352-357.
- WEIGEL, D., PLACK, M. et GLAZEBROOK, J. 2002 *Arabidopsis* : A Laboratory Manual. *CSHL Press.* pp. 354.
- WENT, F. et THIEMANN. 1937. *Phytohormones.* *MacMillan, New York.* pp. 294.
- XIE, C., ZHANG, J.S., ZHOU, H.L., LI, J., ZHANG, Z.G., WANG, D.W. et CHEN, S.Y. 2003. Serine/threonine kinase activity in the putative histidine kinase-like ethylene receptor NTHK1 from tobacco. *Plant J.* **33**: 385-393.
- XIE, C., ZHANG, Z.G., ZHANG, J.S., HE, X.J., CAO, W.H., HE, S.J. et CHEN, S.Y. 2002. Spatial expression and characterization of a putative ethylene receptor protein NTHK1 in tobacco. *Plant Cell Physiol.* **43**: 810-815
- YANAGISAWA, S., YOO, S.D. et SHEEN, J. 2003. Differential regulation of EIN3 stability by glucose and ethylene signalling in plants. *Nature.* **425**: 521-525.
- YANG, S.F. et HOFFMANN N.E. 1984. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **35**: 155-189.

- YOSHII, H. et IMASEKI, H. 1981. Biosynthesis of auxin-induced ethylene. Effects of indole-3-acetic acid, benzyladenine and abscisic acid on endogenous levels of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) and ACC synthase. *Plant Cell Physiol.* **22**: 369-379.
- ZANETTI, M.E., TERRILE, M.C., ARCE, D., GODOY, A.V., SEGUNDO, L.S. et CASALONGUÉ, C. 2002. Isolation and characterization of a potato cDNA corresponding to a 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) oxidase gene differentially activated by stress. *J. Exp. Bot.* **53**: 2455-2457.