

50376
1999
339



N° d'ordre : 2582

THESE

présentée à l'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

pour obtenir le grade de DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE I
spécialité SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

par

Béatrice RANDOUX

MODIFICATIONS DANS L'EXPRESSION DES GENES AU COURS DE L'EMBRYOGENESE SOMATIQUE CHEZ UN HYBRIDE DE CHICOREE. IDENTIFICATION DE GENES CODANT POUR UNE PROTEINE DE LIAISON AU GTP.

Directeur de thèse : J. Vasseur

Soutenue le 25 NOVEMBRE 1999 devant la commission d'examen :

M. J. VASSEUR	Professeur, Université de Lille	Président
M. G. ALIBERT	Professeur, ENSAT, Toulouse	Rapporteur
M. B. TEYSSENDIER DE LA SERVE	Directeur de Recherches, INRA, Montpellier	Rapporteur
M. J-P. KERCKAERT	Directeur de recherches, INSERM, IRCL, Lille	Examinateur
M. J-L. HILBERT	Maître de conférences, Université de Lille	Examinateur

REMERCIEMENTS

Avant de passer aux choses très sérieuses, je voudrais commencer par remercier toutes les personnes qui ont participé à ces travaux et à leur finalisation.

Je tiens tout d'abord à remercier Monsieur le Professeur Jacques Vasseur de m'avoir accueillie dans son laboratoire et surtout de m'y avoir gardée aussi longtemps! Ces dernières années m'ont permis de vérifier que la vie n'est pas un long fleuve tranquille et qu'il faut savoir s'adapter à toutes les situations. Je remercie Monsieur Vasseur de m'avoir confié ce sujet de recherche, qui m'a permis de découvrir et d'apprécier la biologie moléculaire.

Je remercie Messieurs Gilbert Alibert et Bernard Teyssendier de la Serve d'avoir accepté de juger ce travail en tant que rapporteurs.

Je remercie également Monsieur Jean-Pierre Kerckaert d'avoir accepté de participer à ce jury de thèse, mais aussi de m'avoir reçue pour discuter des résultats obtenus.

Je voudrais aussi remercier Monsieur Jean-Louis Hilbert pour avoir suivi ces travaux de recherche, mais aussi pour les discussions particulièrement animées qui sont venues pimenter ma recherche et la rédaction de ce mémoire. Je le félicite pour avoir réussi à me supporter depuis le DEA et m'avoir appris récemment ce que signifie le mot "abnégation".

Je remercie Caroline pour sa disponibilité et sa bonne humeur, Bruno pour sa gentillesse, sa sympathie innée, sa diplomatie et sa sensibilité tout à fait remarquables (tout le monde est d'accord avec moi, d'ailleurs!), Marie-Christine pour son arrivée au laboratoire et les super discussions de fin de journée, Anne-Sophie pour la cyto, et Théo, because il m'a appris a lot of things.

Aux "pas nous", j'adresse mes remerciements pour la cohabitation que nous avons mené à bien durant ces dernières années et ce sans aucune arrière pensée politique... Et en particulier à Nathalie, à Delphine, ses performances informatiques, ses cookies et muffins, à Bob et ses "Bonjour petite Béatrice (adorée que j'aime tant)", à Olivier, flatteur invétéré, à Jeff qui a retrouvé son petit Grégory, je recommande de ne pas changer. Quoique pour les 3 derniers.....

Je remercie aussi tous les étudiants de l'équipe, qui d'une façon ou d'une autre ont contribué à ce que ces années ont été (intellectuel, non?) : Audrey, qui est en voie d'apprendre ce que signifie "abdication" et Stéphane, fan de Lova Moor, Anne el boulonnaise pour tous ché momins qu 'ej pourré cor m'armémorer din eune pair d'énnaïles, Isabelle pour ses conseils, sa disponibilité et surtout sa gentillesse, Anne la lilloise pour avoir de gros genoux, Axelle pour s'être dévouée à 15H15, Sophie la petite dernière au labo (mais pas la moindrel), Berthe pour son rire si agréable dès le matin et Lolo pour n'avoir jamais réussi à la calmer, et enfin la petite Rachel à sa tata Béa, à qui je souhaite tout le meilleur du monde. Et voilà ! A non, j'oubliais le nain jaune... Bon, pour ne pas faire d'histoires, je remercie aussi Eric, pour tout ce qu'il a fait pour moi, pour toutes les gentillesse qu'il a dites et surtout pour le peu qu'il a su taire.

Une pensée particulière pour Delphine, et Axelle, qui arrivent à la fin de leur périple doctoral, Lolo, Greg et Anne qui ont su se battre pour être docteurs avant moi.

Je remercie aussi Claudine, Congetta, Marcelle et Viviane pour leur gentillesse et pour les cafés partagés.

Merci à mon Guy-Guy, à mes potes des week-ends, mes chats, mes chiens, mes poules... Enfin, pour résumer, je remercie toutes les personnes qui m'ont aidée scientifiquement et moralement au cours de ces années d'apprentissage de la vie plus ou moins active!!!

A mes jambes,
parce qu'elles ont bien voulu
porter mon c..
pendant ces années
passées à déambuler
dans le long couloir
du laboratoire.

SOMMAIRE

ABREVIATIONS	1
--------------	---

INTRODUCTION GENERALE	3
-----------------------	---

1. LES DIFFERENTS TYPES DE REPRODUCTION CHEZ LES VEGETAUX.....	3
--	---

2. PRESENTATION DES CARACTERISTIQUES DE L'EMBRYOGENESE SOMATIQUE ET CONTEXTE DE L'ETUDE.....	4
---	---

ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE	7
-------------------------	---

1. MISE EN EVIDENCE DE L'EXPRESSION DIFFERENTIELLE DE GENES AU COURS DE L'EMBRYOGENESE SOMATIQUE.....	7
--	---

2. PROTEINES EXTRACELLULAIRES.....	11
------------------------------------	----

2. IDENTIFICATION DE MARQUEURS MOLECULAIRES PRECOCES DE L'ACQUISITION DE LA COMPETENCE EMBRYOGENE.....	14
---	----

4. L'EMBRYOGENESE SOMATIQUE DIRECTE CHEZ LA CHICOREE.....	17
---	----

4.1. Le genre <i>Cichorium</i>	17
--------------------------------------	----

4.2. L'embryogenèse somatique chez le <i>Cichorium</i>	18
--	----

4.3. Les marqueurs de l'embryogenèse somatique.....	18
---	----

4.4. Avantages et limites du modèle chicorée dans le contexte de l'étude proposée.....	20
--	----

5. CONCLUSIONS.....	21
---------------------	----

MATERIEL ET METHODES	23
----------------------	----

1. MATERIEL VEGETAL.....	23
--------------------------	----

1.1. Le <i>Cichorium</i> hybride "474".....	23
---	----

1.2. Le milieu de culture utilisé.....	23
--	----

1.3. Obtention des plantules de <i>Cichorium</i> "474".....	24
---	----

1.4. Embryogenèse somatique à partir des feuilles de plantules de <i>Cichorium</i> hybride "474".....	26
--	----

1.5. Récolte du matériel végétal.....	26
---------------------------------------	----

2. COUPES CYTOLOGIQUES EN PARAFFINE.....	26
--	----

3. ANALYSE DES PROTEINES TISSULAIRES SYNTHETISEES DE NOVO.....	26
3.1. Marquage <i>in vivo</i>.....	26
3.2. Extraction des protéines.....	27
3.3. Dosage de la radioactivité incorporée.....	27
3.4. Séparation des protéines par électrophorèse bidimensionnelle.....	28
3.4.1. La première dimension ou isoélectrofocalisation.....	28
3.4.2. La deuxième dimension, réalisée en présence de SDS.....	29
3.4.3. Révélation des protéines au bleu de Coomassie.....	29
3.4.4. Séchage des gels.....	30
3.4.5. Autoradiographies.....	30
3.5. Analyse informatique des gels.....	30
4. EXTRACTION ET PURIFICATION DES ARN MESSAGERS.....	31
4.1. Précautions.....	31
4.2. Extraction et purification des ARN totaux.....	31
4.3. Purification des ARN messagers polyadénylés.....	32
5. TRADUCTION IN VITRO DES ARNm POLYADENYLES.....	33
5.1. Réalisation.....	33
5.2. Analyse des produits de traduction.....	34
6. TRANSCRIPTION INVERSE DIFFERENTIELLE DES ARN MESSAGERS POLYADENYLES ET AMPLIFICATION PAR PCR.....	34
6.1. Transcription inverse différentielle.....	35
6.2. Amplification par PCR.....	37
6.3. Séparation et révélation des ADNc.....	38
6.3.1. En gel d'agarose.....	38
6.3.2. En gel de polyacrylamide.....	38
7. CLONAGE DES PRODUITS DE DDRT-PCR.....	39
7.1. Elution des ADNc des gels de polyacrylamide.....	39
7.2. Clonage.....	39
7.2.1. Purification des échantillons.....	39
7.2.2. Ligation et clonage.....	40
7.3. Séquençage.....	40
7.4. Analyse des séquences : bioinformatique.....	41

7.4.1. Analyse des séquences.....	41
7.4.2. Recherches d'homologies.....	41
8. VERIFICATION DE L'ACCUMULATION DES PRODUITS CLONES.....	43
8.1. Hybridation des produits de DDRT-PCR avec les produits clonés.....	43
8.2. Northern blot.....	43
8.3. RT-PCR non sélective.....	43
9. DETERMINATION DE LA SEQUENCE DE L'EXTREMITE 5' DES PRODUITS CLONES.....	46
9.1. Par criblage d'une banque d'ADNc.....	46
9.2. Par RACE-PCR (Rapid Amplification of CDNA Ends).....	47
10. REPRESENTATION GENOMIQUE.....	49

RESULTATS 51

1. COUPES CYTOLOGIQUES.....	51
2. SYNTHÈSE PROTÉIQUE ET TRADUCTION <i>IN VITRO</i> DES ARN MESSAGERS AU COURS DE LA CINÉTIQUE D'EMBRYOGENÈSE SOMATIQUE.....	54
2.1. Marquage <i>in vivo</i> des protéines.....	55
2.2. Traduction <i>in vitro</i> des ARNm.....	58
3. ISOLEMENT DE GENES EXPRIMÉS AU COURS DES ÉTAPES PRÉCOCES DE L'EMBRYOGENÈSE SOMATIQUE.....	61
3.1. Isolement par DDRT-PCR d'ADNc partiels correspondant à des ARNm exprimés différemment au cours de l'embryogenèse somatique.....	61
3.1.1. Profils d'ADNc obtenus.....	61
3.1.2. Choix et isolement d'ADNc partiels correspondant à des ARNm transcrits différemment.....	62
3.1.3. Séquençage des clones d'ADNc partiels isolés.....	64
3.1.4. Spécificité des produits B1.5 et B5.3.....	67
3.1.4.1. Produit B1.5.....	67
3.1.4.2. Produit B5.3.....	68
3.2. Étude du gène B5.3.....	70
3.2.1. Expression du gène B5.3.....	70
3.2.2. Recherche des ADNc complets.....	70

3.3. Etude du gène B1.5	71
3.3.1. Expression du gène B1.5.....	71
3.3.1.1. Northern blots.....	71
3.3.1.2. RT-PCR non sélective.....	72
3.3.2. Obtention des ADNc complets.....	73
3.3.2.1. Par criblage d'une banque d'ADNc.....	72
3.3.2.2. Par RACE-PCR.....	78
3.3.2.3. Analyse des séquences complètes.....	82
3.3.3. Représentation génomique.....	89

DISCUSSION 95

1. EXPRESSION DES GENES.....95

2. ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DE GENES EXPRIMES

DIFFERENTIELLEMENT.....99

2.1. Mise au point de la technique de DDRT-PCR.....100

2.2. Identification de gènes exprimés différemment.....101

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES 113

BIBLIOGRAPHIE 117

ANNEXES 131

ABREVIATIONS

Acryl-PDA : Acrylamide-Piperazine DiAcrylamide
ADN : Acide DésoxyRiboNucléique
ADNc : Acide DésoxyRiboNucléique complémentaire
AIA : Acide Indolyl Acétique
AMV : Avian Myeloblastosis Virus
ANA : Acide NaphtylAcétique
APS : Ammonium PerSulfate (persulfate d'ammonium)
ARNm polyA+ : Acide RiboNucléique messenger polyadénylé
ARNr : Acide RiboNucléique ribosomal
ARNt : Acide RiboNucléique de transfert
BET : Bromure d'EThydium
Pévèle : *Cichorium intybus* var. *sativum* cv. Pévèle
Ci : Curie
cpm : coup par minute
CsCl : Chlorure de Césium
Da : Dalton
DDRT-PCR : Differential Display Reverse Transcription (transcription inverse différentielle) et amplification par PCR
DEPC : DiEthyl-PyroCarbonate
DMPC : DiMéthyl-PyroCarbonate
dNTP : désoxyriboNucléotide TriPhosphate
EDTA : Ethylène Diamine TétraAcétate
EST : Expressed Sequence Tag (étiquette de séquence exprimée)
GIT : Guanidium IsoThiocyanate (isothiocyanate de guanidine)
gly : glycérol
GTP : Guanidine TriPhosphate
HSP : Heat Shock Protein (protéine de choc thermique)
IEF : IsoElectroFocalisation
kDa : kiloDalton
M : Molaire
 μ M : micromolaire
mM : millimolaire

- Abréviations-

min. : minute

ml : millilitre

M17S20 : milieu de Murashige et Skoog modifié, avec 20g/l de saccharose

NCBI : National Center for Biotechnology Information

oligo-dT : oligonucléotide de Thymidines

ORF : Open Reading Frame (cadre de lecture ouvert)

pb : paire de bases

PCR : Polymerase Chain Reaction (réaction de polymérisation en chaîne)

PCRNS : PCR Non Sélective

PDA : Piperazine DiAcrylamide

pI : point Isoélectrique

Protéine LEA : Late Embryogenesis Abundant (protéine abondante lors des stades tardifs de l'embryogenèse)

p/v : poids/volume

RACE-PCR : Rapid Amplification of cDNA Ends-PCR (amplification aléatoire des extrémités d'ADNc)

RAPD : Random Amplified Polymorphic DNA (ADN polymorphe amplifié au hasard)

rpm : révolution par minute

SDS : Sodium DodécylSulfate

SDS-PAGE : SDS-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis

SMG : Small GTP-binding protein (petite protéine de liaison au GTP)

SSC : Saline Sodium Citrate (citrate de sodium salin)

TBE : Tris Borate EDTA

TCA : TriChloroAcétate

TE : Tris EDTA

TEMED : N,N,N',N', tétraméthyl-éthylène diamine

Tris : Tris (hydroxyméthyl) aminométhane

UKS : Urée carbonate de potassium SDS

UV : Ultra Violet

V : Volt

var. : variété

v/v : volume/volume

2IP : 6-diméthylallylamino-purine (N6-[2 IsoPentényl] adénine)

2,4-D : acide 2,4 Dichlorophénoxy-acétique

°C : degré Celsius

**INTRODUCTION
GENERALE**

INTRODUCTION GENERALE

1. LES DIFFERENTS TYPES DE REPRODUCTION CHEZ LES VEGETAUX.

La reproduction sexuée croisée est le mode de reproduction le plus répandu, aussi bien dans le règne animal que dans le règne végétal. Elle aboutit à la formation d'un zygote à $2n$ chromosomes par fusion de 2 cellules sexuelles (gamètes) à n chromosomes, provenant de deux individus différents. L'individu issu de cette fusion est donc génotypiquement différent de ses parents. La reproduction sexuée permet ainsi aux espèces de s'adapter à leur environnement, grâce au brassage génétique qu'elle induit.

Dans le règne animal, hormis chez quelques invertébrés, la reproduction sexuée est le seul moyen naturel d'assurer la pérennité d'une espèce. A l'inverse, les végétaux disposent d'une grande plasticité dans le choix de leur mode de reproduction, qui s'exprime par le maintien de multiples systèmes de reproduction non exclusifs.

Ainsi, la production de graines ne nécessite pas toujours l'intervention d'un second individu, car la plupart des végétaux sont hermaphrodites. Certaines plantes telles que la tomate, le blé, le riz, sont ainsi capables d'autofécondation. Chez d'autres espèces, la reproduction asexuée est privilégiée. Ce mécanisme assure la stabilité de l'espèce en générant des individus identiques. Ce type de reproduction existe dans la nature de manière spontanée, par production de stolons, drageons, bulbilles..., mais aussi par parthénogenèse et apomixie, processus qui permettent le développement *in vivo* d'un embryon sans fécondation, par différentes déviations affectant la différenciation du gamétophyte femelle et plus tardivement le programme de la gamétogenèse. Les individus obtenus sont alors génotypiquement identiques à la plante initiatrice.

L'homme a su tirer profit de ces caractéristiques. Par greffage ou bouturage, il a amélioré la multiplication, voire la survie de certaines plantes d'intérêt agronomique, comme certaines variétés de pêchers et de vignes. Le développement des techniques de culture *in vitro* a ensuite permis l'extension de la multiplication végétative à un grand nombre d'espèces. La manifestation de la potentialité organogène *in vitro* illustre la totipotence des cellules végétales, capables de retrouver momentanément l'état méristématique avant de s'orienter dans une autre voie de différenciation. Hormis la néoformation de bourgeons et de racines, cette totipotence autorise également la formation d'embryons *in vitro*, sans qu'il y ait fécondation. Suivant la nature du tissu initiateur,

différents types d'embryogenèse sont inductibles. Des cellules sexuelles isolées et cultivées *in vitro* peuvent changer leur programme de développement et être à l'origine d'embryons haploïdes : il s'agit de gynogenèse ou d'androgyenèse. Après doublement du stock chromosomique, des lignées pures homozygotes sont obtenues. De même, au sein de tissus somatiques, certaines cellules sont capables de produire des embryons diploïdes : il s'agit d'embryogenèse somatique.

Mise en évidence chez la carotte en 1958 (Reinert et al., 1958 ; Steward et al., 1958), l'embryogenèse somatique s'est révélée inductible *in vitro* chez de nombreuses autres espèces d'intérêt agronomique ou horticole. Elle peut se produire de façon spontanée *in vivo*, comme chez une fougère du genre *Malaxis* ou le Kalanchœ, où les embryons se forment sur les bordures des feuilles. Mais ce phénomène reste exceptionnel. L'embryogenèse somatique représente un moyen de production clonale en grande quantité, mais aussi un système de régénération efficace pour les expériences de transformation génétique. D'un point de vue fondamental, les embryons somatiques constituent un matériel directement accessible pour l'étude des mécanismes qui déterminent et accompagnent l'ontogenèse *in planta*.

2. PRESENTATION DES CARACTERISTIQUES DE L'EMBRYOGENESE SOMATIQUE ET CONTEXTE DE L'ETUDE.

L'embryogenèse somatique est un processus qui comporte trois phases successives conduisant à l'obtention d'individus. La phase d'induction détermine la mise en place du processus ; elle correspond à la période de culture qui précède l'apparition de modifications morphologiques au sein des tissus induits. La phase d'expression de l'embryogenèse somatique se caractérise par la formation des embryons globulaires et englobe leur évolution jusqu'au stade cotylédonnaire. La troisième et dernière phase correspond à une phase de maturation, plus ou moins longue suivant les espèces. Elle permet aux embryons d'accumuler des molécules de réserve indispensables pour le développement ultérieur en jeunes plantules (Emons, 1994).

La phase d'induction diffère suivant qu'il s'agit d'une embryogenèse directe ou d'une embryogenèse indirecte. Lors d'une embryogenèse directe, certaines cellules somatiques de l'explant se dédifférencient, c'est-à-dire qu'elles retrouvent leur capacité à se diviser, puis se redifférencient dans une autre voie que celle existant initialement et produisent directement des embryons. Dans le cadre d'une embryogenèse indirecte, une étape intermédiaire de multiplication indifférenciée est observée. Les cellules de l'explant

végétal se dédifférencie, entreprennent une phase de divisions cellulaires inorganisées et forment un cal, dont certaines cellules manifesteront une compétence à l'embryogenèse somatique.

La phase de développement est identique dans les deux cas ; les embryons somatiques suivent en général les mêmes étapes de développement que les embryons zygotiques (Zimmerman et al., 1993). Si une phase de maturation existe, son déterminisme est souvent lié à l'espèce considérée.

L'avènement d'une embryogenèse somatique n'est pas modélisable : il n'existe pas de conditions de culture propres à l'embryogenèse somatique. Même si de nombreux végétaux sont ainsi multipliés, leur aptitude à l'embryogenèse somatique ne se manifeste que lorsqu'ils sont soumis à des conditions de cultures strictes et bien définies. La mise en place d'une embryogenèse somatique dépend de nombreux facteurs, chimiques et physiques, dont l'application mesurée, simultanée ou séquentielle, sera déterminante pour l'acquisition de la compétence chez une espèce, voire chez un génotype particulier. Dans la plupart des cas, l'application d'une auxine est souvent désignée comme responsable de la réactivation cellulaire et de la reprise des divisions qui s'orientent dans la voie de l'embryogenèse, mais d'autres molécules ou certains stress physiques peuvent également diriger ce phénomène (Emons, 1994).

Cette absence de généralisation explique les difficultés qui résident dans la compréhension du déterminisme de l'embryogenèse somatique. Comment ces différents facteurs agissent-ils ? Quelles en sont les cibles ? Quelles sont les modifications induites dans l'expression des gènes au cours de l'initiation de l'embryogenèse somatique ?

Pour tenter de répondre à ces questions, nous nous sommes intéressés aux altérations biochimiques et moléculaires accompagnant la mise en place de l'embryogenèse directe chez un hybride de chicorée. Notre objectif est de pouvoir appréhender les mécanismes précoces de l'embryogenèse somatique chez cette chicorée au niveau moléculaire, en caractérisant des gènes s'exprimant en relation avec l'embryogenèse somatique. Nous avons dans un premier temps analysé l'ampleur des modifications intervenant dans l'accumulation des transcrits lors de l'établissement de l'embryogenèse somatique, puis cherché à caractériser certains transcrits potentiellement corrélés à ce processus. Toutefois, notre modèle d'embryogenèse somatique comporte certaines limites que nous développerons lors de la présentation du système biologique étudié.

La première partie de ce mémoire présente une analyse bibliographique des connaissances actuelles concernant les protéines synthétisées et les gènes transcrits

différentiellement au cours de l'embryogenèse somatique. La chicorée hybride "474", système biologique utilisé pour notre étude, est décrit ; ses avantages et ses limites vis à vis de l'étude proposée y sont également présentés.

Les deuxième et troisième parties décrivent respectivement les stratégies expérimentales développées et les résultats obtenus. Avant de rechercher à l'échelle moléculaire des modifications potentiellement impliquées dans l'embryogenèse somatique, nous avons réalisé une étude cytologique du processus. Elle nous a permis d'établir une chronologie des évènements cellulaires se produisant au cours de la cinétique d'obtention des embryons somatiques, et nous a servi de référence pour l'ensemble des travaux réalisés. Nous avons ensuite effectué l'analyse des profils correspondant d'une part aux protéines néosynthétisées au cours de la cinétique d'embryogenèse somatique, et d'autre part aux produits de traduction *in vitro* des ARNm présents à différents stades de l'établissement de l'embryogenèse somatique. Ceci nous a permis de visualiser de nombreuses modifications de l'expression des gènes aux niveaux transcriptionnel et post-transcriptionnel tout au long du processus. Nous avons ensuite adapté la technique de mRNA differential display (Liang et Pardee, 1992) pour sélectionner des gènes exprimés au cours de la cinétique embryogène. Pour déterminer leur degré de liaison à l'embryogenèse somatique, nous avons analysé en parallèle leur comportement chez un génotype embryogène, la chicorée hybride "474", et un génotype non embryogène dans nos conditions de culture, la chicorée Pévèle (*Cichorium intybus* var. *sativum* cv. Pévèle).

Dans une quatrième partie, les résultats obtenus sont discutés. Nous avons tenté d'appréhender le rôle potentiel des gènes étudiés dans le déroulement de l'embryogenèse.

La cinquième et dernière partie apporte une conclusion générale à nos travaux, et ouvre des perspectives de recherches sur le déterminisme de l'embryogenèse somatique.

PREMIERE PARTIE

ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

EXPRESSION DE GENES ET EMBRYOGENESE SOMATIQUE.

La réinitiation d'un programme d'ontogenèse tel que l'embryogenèse somatique suggère l'existence de modifications dans l'expression des gènes qui était préalablement établie. Les études moléculaires concernant l'embryogenèse somatique ont débuté dans les années 80. Elles furent pour la plupart menées chez la carotte (*Daucus carota* L.), devenue "plante modèle" de ce type d'étude. Dans un premier temps, les recherches visaient à déterminer les modifications intervenant dans l'expression des gènes au cours du processus, ce qui a mené à l'identification de certains gènes dont l'implication dans le phénomène d'embryogenèse somatique restait le plus souvent à préciser. Parallèlement, une étude de la composition du milieu de culture des tissus ou des cellules lors de l'initiation et de l'expression de l'embryogenèse somatique a permis la mise en évidence de protéines secrétées différenciellement ; certaines sont maintenant connues chez diverses espèces. Le développement de techniques d'analyse moléculaire plus performantes ont ensuite conduit à l'identification de gènes dont l'expression était directement reliée à la mise en place de l'embryogenèse somatique, permettant ainsi de mieux caractériser le déterminisme de ce processus morphogène.

1. MISE EN EVIDENCE DE L'EXPRESSION DIFFERENTIELLE DE GENES AU COURS DE L'EMBRYOGENESE SOMATIQUE.

Pour appréhender les modifications pouvant intervenir dans l'expression des gènes au cours de l'embryogenèse somatique, différentes méthodologies ont été employées. L'une d'entre elles consistait à comparer la synthèse protéique à différents stades de la mise en place du processus. Cette technique a permis d'aboutir à la détection de marqueurs biochimiques de l'embryogenèse somatique, mais ne présumait pas du type de régulation, transcriptionnelle ou traductionnelle, impliqué dans l'expression des gènes. Une autre méthode d'étude, pouvant compléter la première, est basée sur l'analyse des produits intermédiaires de l'expression des gènes, les ARNm. Ces deux techniques ont permis d'identifier des protéines et ARNm dont la présence peut correspondre à la notion de marqueur de l'embryogenèse somatique.

De tels marqueurs biochimiques ou moléculaires, produits finaux ou intermédiaires de l'expression des gènes, sont appelés précoces lorsqu'ils apparaissent avant toute

modification morphologique au sein des cultures voire même avant toute division des cellules embryogènes, et tardifs lorsqu'ils sont reliés au processus de développement des embryons somatiques (Dudits et al., 1995). L'identification de marqueurs tardifs de la différenciation et du développement des embryons somatiques a permis le plus souvent de mieux comprendre, par analogie, le développement des embryons zygotiques dont l'étude est souvent difficile du fait du lien étroit qui existe entre l'embryon et les tissus maternels. La recherche de modifications intervenant précocément et l'identification de gènes dont l'expression est modifiée lors de l'acquisition de la potentialité embryogène visaient à caractériser le déterminisme de ce processus. C'est au cours de la phase d'induction et au début de la phase d'expression que de tels marqueurs de l'embryogenèse ont été détectés, puisque les étapes déterminant l'obtention d'embryons somatiques se déroulent bien avant que ces derniers soient formés.

Dès 1981, une synthèse différentielle de protéines a été mise en évidence chez la carotte, où l'embryogenèse a une origine indirecte. Après transfert des cellules du milieu d'induction sur le milieu d'expression, deux protéines de 77 et 43 kDa sont synthétisées, juste avant la formation des embryons globulaires. Leur synthèse continue lors du développement des embryons, mais elle n'est pas détectée dans des cals en condition non embryogène (Sung, 1981). Chez le pois (*Pisum sativum*), deux protéines de 70 et 45 kDa sont également synthétisées spécifiquement par les cals embryogènes (Stirn et Jacobsen, 1987). D'une manière plus générale, Sung et Okimoto (1983) suggèrent l'existence d'une régulation coordonnée de l'expression des gènes au cours de l'embryogenèse somatique, se manifestant par l'activation de certains gènes et l'inhibition de l'expression de certains autres, suivant la phase considérée. Une autre protéine, nommée ECP31, a été purifiée à partir d'une culture de cellules embryogènes de carotte. D'un poids moléculaire de 31 kDa, cette protéine s'accumule de façon presque exclusive dans les cellules embryogènes ; elle n'existe ni dans les cellules non embryogènes, ni dans les embryons somatiques en développement (Kiyosue et al., 1990, 1991). Sa séquence protéique présente près de 80% d'homologie avec la protéine LEA D34 de coton (LEA pour Late Embryogenesis Abundant). Comme pour d'autres protéines LEA, l'ajout d'acide abscissique peut déclencher sa synthèse dans les embryons somatiques (Kiyosue et al., 1992). Bien que ECP31 soit un marqueur tardif du développement des embryons zygotiques (Kiyosue et al., 1990), cette protéine peut être considérée comme un marqueur de l'embryogenèse somatique puisqu'elle s'accumule essentiellement dans les cellules embryogènes.

Peu de protéines sont considérées comme spécifiques de l'acquisition de la compétence embryogène. Dès 1986, Nomura et Komamine suggèrent que la plupart des fonctions nécessaires à l'embryogenèse somatique sont déjà établies ou prédéterminées au sein des masses pro-embryogènes en suspension en présence d'auxine (Nomura et

Komamine, 1986). La détection de marqueurs exclusifs de l'induction de l'embryogenèse reste donc exceptionnelle à cette époque, avec les techniques de détection utilisées. En 1996, Giroux et Pauls ont mis en évidence l'existence de polypeptides reliés à l'induction de l'embryogenèse somatique chez la luzerne (*Medicago sativa* L.). En effet, 3 polypeptides de 50 kDa associés à la membrane sont détectés dans des suspensions cellulaires de plusieurs génotypes embryogènes après 7 jours d'induction. Ces polypeptides et les ARNm correspondants sont absents des génotypes non embryogènes, ce qui suggère leur implication dans l'embryogenèse somatique chez la luzerne (Giroux et Pauls, 1996).

D'autres protéines synthétisées au cours de l'embryogenèse somatique ont été caractérisées. Chez la carotte, l'utilisation d'anticorps dirigés contre des extraits protéiques totaux d'embryons somatiques ne met en évidence que très peu de différences entre les protéines extraites des cellules en croissance inorganisée et celles présentes dans les embryons somatiques. Les différences observées sont quantitatives ; certaines protéines sont plus abondamment synthétisées dans les embryons qu'en condition de croissance inorganisée. Une seule protéine de 50 kDa semble corrélée à la présence des embryons somatiques, elle correspond au clone d'ADNc nommé DC49, qui n'a pas été identifié (Choi et al., 1987).

Des protéines de type LEA (Late Embryogenesis Related) ont été mises en évidence au cours de l'embryogenèse somatique par l'utilisation d'autres outils analytiques. En 1988, deux marqueurs de type LEA (DC3 et DC8) ont été identifiés chez la carotte. Les ARNm correspondant au clone DC3 sont transcrits dans les masses pro-embryogènes et les embryons somatiques à différents stades de développement, alors qu'ils sont absents d'autres tissus. DC3 est donc considéré comme un marqueur de la potentialité embryogène, mais il est aussi un marqueur tardif du développement des embryons (Wilde et al., 1988). Le clone DC8 est quant à lui un marqueur tardif strict, car sa présence n'est décelée qu'au cours du développement des embryons somatiques (Borkid et al., 1988). Chez le bouleau (*Betula pendula* Roth), un gène BP8 a été isolé par hybridation hétérologue de l'ADN génomique avec le gène DC8 de carotte. Il est cependant très faiblement exprimé au cours de l'embryogenèse somatique du bouleau, et ne peut donc pas constituer un bon marqueur chez cette espèce (Puupponen-Pimiä et al., 1993).

Un autre clone correspondant à une protéine de type LEA a été identifié chez la carotte et nommé EMB1. Les ARNm correspondants présentent la même cinétique d'accumulation lors du développement des embryons somatiques et des embryons zygotiques dès le stade globulaire, avec un maximum de transcription au stade torpille (Wurtele et al., 1993).

Chez d'autres espèces, les profils protéiques globaux ont été également analysés. Chez *Dactylis glomerata*, 21 protéines sont spécifiques des embryons somatiques, et 6 autres sont spécifiques des cals. La traduction *in vitro* des ARNm et le marquage *in vivo* des protéines révèlent l'existence de différents niveaux de régulation de la synthèse de ces polypeptides, soit au niveau transcriptionnel, soit au niveau post-transcriptionnel (Hahne et al., 1988). Des expériences similaires ont été menées chez *Digitalis lanata* et *Nicotiana plumbaginifolia*. Les profils polypeptidiques obtenus après marquage *in vivo* montrent des modifications dans la synthèse protéique lors de l'induction et du déroulement de l'embryogenèse somatique. Des protéines spécifiques des masses pro-embryogènes et d'autres spécifiques des embryons somatiques sont détectées. En particulier chez *Nicotiana plumbaginifolia*, certaines modifications de la synthèse protéique sont corrélables à une altération similaire des ARNm, impliquant l'existence d'un mode de contrôle transcriptionnel de l'expression des gènes correspondants. D'autres ne sont pas imputables à des modifications de la transcription des ARNm correspondants, suggérant l'existence d'un mode de contrôle post-transcriptionnel pour de nombreuses protéines. Les auteurs se sont également intéressés à l'évolution des gènes LEA au cours de la cinétique d'embryogenèse somatique. L'utilisation d'une sonde oligonucléotidique de séquence spécifique de gènes LEA de différentes espèces a mis en évidence l'existence de 2 ARNm correspondants, aussi bien chez *Nicotiana plumbaginifolia* que chez *Digitalis lanata*. Ils présentent un faible taux de transcription dans les masses pro-embryogènes, taux qui s'intensifie lors de la formation des embryons globulaires ; mais ces 2 ARNm ne sont plus transcrits au stade coeur (Reinbothe et al., 1992 a et b).

Ainsi, les techniques d'analyses précédemment décrites ont permis de mettre en évidence une expression différentielle de gènes au cours de l'embryogenèse somatique. Les modifications observées sont pourtant modestes comparées à la complexité histologique de l'embryogenèse somatique. Des marqueurs tardifs de l'embryogenèse ont été détectés, voire identifiés, mais l'acquisition de la compétence embryogène n'a pas été caractérisée. Même si l'expression différentielle de certains gènes au cours de l'embryogenèse somatique suggère leur implication dans le processus, aucune relation causale entre leur expression et le phénomène n'a été prouvée, bien que leur expression y soit parfois corrélée.

2. PROTEINES EXTRACELLULAIRES.

Des petits amas cellulaires de carotte en suspension dans un milieu contenant de l'auxine sont capables de former des embryons somatiques quand ils sont transférés dans un milieu dépourvu d'auxine. L'auxine agit donc comme un facteur inducteur mais inhibe

chez la carotte le développement embryonnaire, puisque les cellules maintenues dans un milieu contenant de l'auxine poursuivent une croissance indifférenciée. Tout au long de la culture, des échanges bidirectionnels s'établissent entre les cellules et leur environnement. Ainsi, des macromolécules sont secrétées par les cellules en suspension, d'où le passage progressif d'un milieu de culture de composition fixée et connue à un milieu appelé "conditionné" (Sung et Okimoto, 1983). Ces molécules, regroupant des polysaccharides, protéoglycanes et polypeptides, proviennent vraisemblablement de la paroi des cellules (Van Engelen et al., 1992). Les polypeptides détectés dans le milieu de culture ont été particulièrement étudiés. Ces protéines extracellulaires sont le plus souvent émises de façon séquentielle par les cellules en suspension, suivant leur état de différenciation. Certaines de ces protéines peuvent être synthétisées particulièrement en conditions de croissance indifférenciée, d'autres spécifiquement lors du processus d'embryogenèse somatique ; ces dernières sont souvent considérées comme des marqueurs de développement. Des glycoprotéines aux fonctions enzymatiques variées comme des chitinases, des peroxydases et des protéines de transfert des lipides ont été détectées chez la carotte, mais aussi chez d'autres espèces embryogènes.

Ainsi chez la carotte, deux glycoprotéines extracellulaires ont été mises en relation avec la formation des embryons somatiques. L'une, de 57 kDa, est secrétée en présence d'auxine alors qu'aucun embryon n'est formé ; l'autre, de 65 kDa, apparaît lorsque le 2,4-D est supprimé du milieu de culture, condition déterminant la mise en place de l'embryogenèse somatique (Sato et al., 1986). L'existence de telles protéines, reliées à l'état de différenciation des cellules, est confirmée par les travaux de de Vries et de ses collaborateurs. Suivant qu'elles sont maintenues en condition de prolifération en présence de 2,4-D, ou mises en condition d'embryogenèse somatique en absence de 2,4-D, les suspensions cellulaires de carotte secrètent de façon différentielle des protéines extracellulaires. L'acquisition du potentiel embryogène est considérablement accélérée lorsque les extraits protéiques extracellulaires, présents dans le milieu de culture de la phase embryogène (milieu dit "conditionné"), sont ajoutés dès l'initiation d'une nouvelle culture. De plus, des lignées ayant perdu leur potentiel embryogène présentent des profils protéiques extracellulaires différents de ceux des lignées embryogènes, alors qu'elles sont cultivées en conditions normales d'embryogenèse.

Certaines de ces protéines, liées à la mise en place de l'embryogenèse, sont des glycoprotéines ; leur présence sous forme glycosylée apparaît essentielle à la différenciation de cellules en embryons somatiques : l'addition de tunicamycine, un inhibiteur des N-glycosylations, empêche la formation des embryons somatiques. Cette inhibition est réversée par l'ajout de glycoprotéines natives venant d'un milieu de culture conditionné (de Vries et al., 1988a ; 1988b). Ces dernières ont été purifiées et 4 isozymes

d'une glycoprotéine de 38 kDa ont été isolées, deux d'entre elles ont été identifiées comme des peroxidases cationiques impliquées dans la réversion observée (Cordewener et al., 1991). Chez la vigne (*Vitis vinifera* cv. Chasselas x *Vitis berlandieri*), une peroxidase cationique de 36 kDa a également été isolée dans le milieu de culture de suspensions embryogènes (Coutos-Thevenot et al., 1992).

A l'inverse, une famille de glycoprotéines, nommées EP1, est associée aux cellules non embryogènes de carotte. Elles sont secrétées tout au long de la culture (van Engelen et al., 1991). Toutefois chez la luzerne, 2 protéines homologues de EP1 évoluent différemment : l'une décroît quantitativement, l'autre disparaît en conditions d'embryogenèse (Poulsen et al., 1996).

Chez le *Citrus* (*Citrus aurantium* L.), des protéines sont également secrétées de façon différentielle au cours de l'établissement de l'embryogenèse somatique. Alors que les profils des extraits protéiques intratissulaires des masses proembryogènes et des embryons sont très proches, l'embryogenèse s'accompagne de la diminution d'une classe de glycoprotéines extracellulaires de 53 et 57 kDa, et de l'apparition de 4 autres protéines de 41 et 42 kDa dans le milieu de culture. Au cours du développement des embryons somatiques, l'ajout du groupe de protéines de 53 à 57 kDa, isolé du milieu de culture des masses proembryogènes, bloque le développement des embryons (Gavish et al., 1991 ; 1992). De même chez l'orge (*Hordeum vulgare* L.), des protéines sont secrétées de façon particulière au cours de la croissance indifférenciée et de la mise en place de l'embryogenèse (Nielsen et al., 1992). Une glycoprotéine de 46 kDa est corrélée à l'aptitude embryogène, une autre de 17,4 kDa est associée à la perte du potentiel de régénération (Stirn et al., 1995).

D'autres types de protéines extracellulaires accompagnent l'embryogenèse somatique chez la carotte. Une protéine extracellulaire de 10 kDa désignée EP2, secrétée uniquement par les cellules embryogènes et par les embryons somatiques, a été identifiée comme une protéine de transfert de lipides non spécifique (nsLTP). L'expression du gène EP2 est localisée dans le protoderme des embryons somatiques mais aussi des embryons zygotiques. Cette protéine pourrait jouer un rôle dans la synthèse de la couche de cutine qui entoure les embryons (Sterk et al., 1991). D'autres protéines de transfert de lipides associées à l'embryogenèse somatique ont été mises en évidence chez la vigne et la luzerne. Chez la vigne, quatre protéines extracellulaires non glycosylées de 9 kDa sont reconnues par un anticorps polyclonal anti-LTP de maïs ; leur activité est spécifique de la phase embryogène et leur séquence présente des homologies importantes avec la LTP non spécifique de carotte (Coutos-Thevenot et al., 1993). Une protéine homologue de la nsLTP de carotte est également présente dans les suspensions de luzerne embryogènes,

elle est décelée beaucoup plus abondamment durant la phase d'expression de l'embryogenèse (Poulsen et al., 1996).

L'existence d'une lignée mutante chez la carotte a permis d'isoler une autre protéine impliquée dans le processus embryogène. La lignée cellulaire ts11 est une lignée mutante thermosensible. Capable d'embryogenèse somatique, le développement des embryons somatiques est néanmoins bloqué au stade globulaire si la température n'est pas de 24°C. L'addition de protéines extracellulaires provenant d'une lignée embryogène non mutée permet la transition du stade globulaire au stade coeur à une température non permissive de 32°C (Lo Schiavo et al., 1990). Une glycoprotéine EP3 de 32 kDa est responsable de cette réversion. Il s'agit d'une endochitinase acide, qui permet la formation d'un protoderme normal chez les embryons de la lignée mutante. Toutefois, l'arrêt du développement embryonnaire chez le mutant à une température non permissive n'est pas dû à l'absence ou à une modification structurale de cette endochitinase, mais à une diminution transitoire de l'excrétion de cette protéine EP3 (De Jong et al., 1992 ; 1995). Après purification et analyses moléculaires, 6 chitinases ont été isolées ; deux d'entre elles appartiennent à la classe IV d'endochitinases et augmentent la production d'embryons globulaires à une température non permissive ; une troisième appartenant à la même classe ainsi qu'une endochitinase de classe I contribuent à la transition des embryons du stade globulaire au stade coeur. Au moins deux gènes homologues de la classe IV des EP3 existent dans le génome de la carotte (Kragh et al., 1996).

D'autres protéines secrétées dans le milieu de culture ont pu être reliées à des modifications morphologiques intervenant au cours de l'embryogenèse. Chez la carotte, une xyloglycane-endotransglycosylase présente une activité extracellulaire importante lors de l'apparition des stades coeur, torpille et cotylédonnaire, alors qu'elle est indétectable au stade d'embryon globulaire. Elle est supposée contribuer à l'élongation cellulaire, son rôle étant de dégrader les xyloglycane pariétaux, ce qui permet d'augmenter l'élasticité de la paroi (Hetherington et Fry, 1993). Chez *Picea abies*, il existe également une relation entre la morphologie des embryons somatiques et la présence de 3 glycoprotéines dans le milieu de culture (Egertsdotter et al., 1993). Chez *Pinus caribaea*, des tissus embryogènes produisent des protéines extracellulaires glycosylées, corrélées avec la différenciation des embryons somatiques. Certaines ont été identifiées comme des germes, protéines mises en évidence dans des embryons de blé en germination (Domon et al., 1994 ; 1995).

Ainsi, différents types de protéines sont secrétées dans le milieu de culture au cours de l'embryogenèse somatique chez diverses espèces. Leur sécrétion est souvent nécessaire pour la réalisation d'une étape précise dans la chronologie du développement des embryons. Chez la carotte, l'ajout de Brefeldine A à une culture de cellules embryogènes bloque l'évolution du processus. La Brefeldine A est un inhibiteur de la

secrétion protéique. Une réversion partielle est obtenue par addition de milieu conditionné. Au cours de l'embryogenèse, cet inhibiteur a un effet majeur sur la conversion des embryons globulaires en embryons cordiformes. Chez les végétaux, un tel traitement entraîne des modifications structurales de l'appareil de Golgi et du réticulum endoplasmique des cellules concernées, empêchant la formation des vésicules de sécrétion (Capitanio et al., 1997). Des processus d'exocytose seraient donc associés à l'embryogenèse somatique. Pourtant, aucun gène codant pour des protéines impliquées dans la sécrétion n'a encore été mis en évidence au cours de l'embryogenèse somatique.

3. IDENTIFICATION DE MARQUEURS MOLECULAIRES PRECOSES DE L'ACQUISITION DE LA COMPETENCE EMBRYOGENE.

De nombreuses espèces végétales sont maintenant capables de produire des embryons somatiques *in vitro*, qu'il s'agisse de monocotylédones ou de dicotylédones. Mais dans la plupart des cas, l'embryogenèse est indirecte. Ainsi, la détection de marqueurs précoces de l'acquisition de la compétence embryogène est difficile, car les cellules concernées sont souvent très peu nombreuses et difficiles à caractériser au sein des cellules poursuivant une croissance inorganisée. De plus, certains gènes déterminants peuvent n'être exprimés que de façon transitoire lors du processus embryogène. Les études récentes utilisent des techniques plus performantes (hybridation soustractive, DDRT-PCR, hybridation *in situ*...) pour analyser les remaniements précoces affectant l'expression des gènes et ainsi palier les problèmes intrinsèques du modèle d'embryogenèse indirecte.

Chez le riz (*Oriza sativa* L.), des expériences d'hybridation *in situ* ont montré qu'un gène OSH1 contenant une homéoboîte est exprimé à partir du stade globulaire, mais son expression précède la formation des pôles caulinaire et racinaire. Ce gène est également exprimé chez un mutant embryogène, mais chez qui le développement des embryons est bloqué rapidement. Il est donc relié à un procédé de régulation qui précède et intervient indépendamment de la formation des organes. Comme chez les animaux, ce gène supposé homéotique pourrait jouer un rôle important dans la localisation de l'identité cellulaire durant les premières étapes de l'embryogenèse (Sato H. et al., 1996). Même s'il est exprimé spécifiquement au stade globulaire, il est néanmoins qualifié de marqueur précoce, car sa manifestation précède toute organisation cellulaire visible, donc toute différenciation. Un autre gène homéotique est exprimé de façon différentielle au cours de l'embryogenèse somatique chez le soja (*Glycine max* L.). Ce gène SBH1 présente le même profil d'accumulation que OSH1 (Ma et al., 1994).

Chez la carotte, un gène nommé CEM 1 a été isolé par criblage différentiel. Il est abondamment transcrit de façon transitoire lors de la formation des embryons globulaires. La séquence polypeptidique qui en est déduite présente une forte homologie avec le facteur d'élongation EF1 α des cellules eucaryotes. EF1 est nécessaire pour l'élongation de la chaîne peptidique lors de la synthèse protéique dans les ribosomes (Komamine et al., 1992). Un autre ARNm, correspondant à l'ADNc CEM6, est spécifiquement transcrit durant l'embryogenèse somatique. Il code pour une protéine riche en glycine (GRP). Il est présent dès le premier jour après transfert des amas de cellules embryogènes sur le milieu d'expression. La protéine CEM6 appartient à la classe des GRP associées à la paroi. Sa présence est concomitante à la différenciation de l'épiderme et des tissus vasculaires. C'est son expression très précoce durant les premières étapes de division cellulaire orientée dans la voie embryogène qui fait du gène CEM6 un bon marqueur précoce de différenciation (Sato S. et al., 1995).

Une autre équipe a mis en évidence l'existence d'un gène exprimé de façon transitoire lors de l'initiation de cultures embryogènes de carotte. Un suivi vidéo des cultures a permis d'identifier les cellules qui avaient la capacité à donner des embryons le plus rapidement (Toonen et al., 1994). Elles peuvent être classées dans une sous-population de cellules élargies et très vacuolisées, d'une taille inférieure à 30 μm et capables de produire plus de 100 embryons pour 10000 cellules. A partir des ARNm de ces cellules, un clone d'ADNc codant pour un récepteur-kinase (SERK pour Somatic Embryogenesis Receptor Kinase) a été mis en évidence par DDRT-PCR. Ce gène est trop faiblement exprimé pour être détecté par Northern blot, mais la cinétique d'accumulation de son transcrit est visualisée par RT-PCR quantitative et par hybridation *in situ*. Inexistante dans les cellules non embryogènes, l'expression de ce gène cesse après le stade globulaire du développement des embryons. Son expression est corrélée avec l'aptitude des cellules à acquérir l'état de compétence à l'embryogenèse. La protéine SERK serait impliquée dans la cascade de transduction de signaux nécessaires aux premières divisions menant à l'embryogenèse somatique. L'expression du gène SERK dans les embryons zygotiques cesse à la transition du stade globulaire au stade coeur (Schmidt et al., 1997).

Un autre ADNc est différentiellement exprimé chez la carotte après transfert sur milieu de développement des embryons, dépourvu d'auxine. Nommé AX110, il code pour une protéine d'environ 42,6 kDa, mais aucune homologie de séquence nucléique ou protéique n'a été trouvée dans les banques de données (Nagata et al., 1993).

Chez la luzerne, des ARNm correspondant aux ADNc pH3c1 et pH3c11, 2 variants de l'histone H3, s'accumulent de façon différente en condition d'embryogenèse. Le transcrit H3-1 est détecté à son niveau le plus haut 1 jour après traitement des cellules par

le 2,4-D ; il est présent à tous les stades du développement des embryons. Il est ainsi assimilé à la classe des gènes d'histone dépendante de la réplication, avec une expression spécifique à la phase S. A l'inverse, le gène correspondant à l'ARNm H3-11 est dans un état continu de transcription active, mais sa transcription est considérablement activée par différents facteurs de stress, tels qu'un choc osmotique ou un traitement auxinique (Kaproš et al, 1992). L'histone H3 est impliquée dans la formation des nucléosomes, qui confèrent à l'ADN sa structure super-enroulée. La reprise des divisions après dédifférenciation implique une réplication importante de l'ADN, ce qui est susceptible de modifier l'expression de gènes codant pour les histones. Des stimuli extérieurs de la division cellulaire peuvent donc influencer la transcription de certains gènes d'histone. Le gène H3-11 pourrait jouer un rôle important dans la modification de la structure des nucléosomes (revue par Dudits et al., 1991). D'autres ARNm transcrits de façon spécifique lors des étapes précoces de l'embryogenèse somatique chez la luzerne ont été récemment détectés par criblage différentiel d'une banque d'ADNc préparée à partir de masses pro-embryogènes. Les ARNm correspondant aux ADNc ASET 1, ASET 2 et ASET 3 sont transcrits dans les masses pro-embryogènes, mais ne sont détectés ni dans des embryons, ni dans des cultures cellulaires d'un génotype non embryogène. Cependant, aucune homologie de séquence avec ces 3 clones n'a été trouvée dans les banques de données (Giroux et Pauls, 1997).

Ainsi, la plupart des marqueurs précoces concernent les étapes de réactivation et d'induction des cellules embryogènes, voire l'initiation des embryons globulaires ; la réactivation cellulaire est toujours une étape préalable à l'induction de l'embryogenèse. Dans la plupart des cas, l'application d'une forte concentration d'auxine permet la reprise des divisions cellulaires menant à l'embryogenèse somatique. Le rôle de l'auxine a été largement étudié, mais son mécanisme d'action lors de l'embryogenèse est peu décrit. Un traitement auxinique induirait une cascade de signaux qui détermineraient la reprise des divisions. La réponse des cellules somatiques végétales à un traitement auxinique présente des analogies avec celle de cellules d'oeuf d'oursin juste après fécondation. Cette similitude donne des pistes pour la recherche de gènes ou de produits de gènes pouvant améliorer la compréhension du déterminisme de l'embryogenèse somatique au niveau moléculaire. L'auxine induirait une réponse cellulaire en activant une cascade de signaux de transduction transmembranaires. Dans ce système, différents éléments serviraient de médiateurs à l'action hormonale, comme les protéines de liaison à l'auxine et les protéines G, protéines de liaison au GTP (Dudits et al, 1991).

Même si le développement de nouvelles méthodes d'analyse moléculaire a permis de mieux caractériser la compétence embryogène, l'existence d'une phase de croissance indifférenciée constitue toujours une barrière à l'avancée des connaissances concernant le

déterminisme de l'embryogenèse somatique (Yeung, 1995). Un modèle expérimental d'embryogenèse somatique directe faciliterait la compréhension des événements cellulaires et moléculaires qui catalysent la transition d'une cellule somatique à une cellule embryogène (Toonen et de Vries, 1996).

4. L'EMBRYOGENESE SOMATIQUE DIRECTE CHEZ LA CHICOREE.

4.1. Le genre *Cichorium*.

Les chicorées appartiennent à la famille des Astéracées et sont réparties en trois espèces européennes : *Cichorium endivia*, *C. intybus* et *C. spinosum*. Les deux premières espèces sont cultivées pour leurs feuilles ou leurs racines, suivant la variété ou le cultivar considéré. Ainsi, l'espèce *endivia* comprend les cultivars *latifolia* et *crispa*, dont les feuilles sont utilisées en salades (scarole et frisée). L'espèce *intybus* comprend diverses variétés d'intérêt agronomique différent. La variété *sativum* Biskoff est plus connue sous le nom de "chicorée à café" ou chicorée industrielle, ses racines grillées servent principalement d'additif au café, mais elles produisent également de l'inuline, qui est une source potentielle de fructose. La variété *foliosum* Biskoff permet la production des endives, qui proviennent de l'étiollement de bourgeons formés sur les racines en conditions de culture artificielles (forçage). La variété *silvestre* Biskoff comporte différents types de chicorées cultivées pour leurs feuilles (Trévis, Vérone, Pain de sucre, Castelfranco...) (Longly et Louant, 1987 ; Leteinturier et al, 1991 ; Vasseur et al., 1995).

4.2. L'embryogenèse somatique chez le *Cichorium*.

Parmi ces espèces, *C. endivia* L. et *C. intybus* L. se sont révélées capables d'embryogenèse somatique indirecte (Vasil et al., 1964 ; Vasil et Hildebrandt, 1966 ; Heirwegh et al., 1985). Les premiers travaux réalisés dans notre laboratoire concernant l'embryogenèse somatique chez la chicorée ont été publiés en 1988. Parmi les génotypes testés, deux ont été capables de produire des embryons somatiques, le *C. intybus* var. Magdebourg cv. "1106" et le *C.* hybride "474" (*C. intybus* var. *sativum* x *C. endivia* var. *latifolia*). Tout d'abord obtenue à partir des organes reproducteurs immatures de plantes cultivées *in vivo*, tels que les styles (Dubois et al., 1988) et les anthères (Guedira et al., 1989), l'embryogenèse somatique s'est révélée inductible à partir de racines (Dubois et al., 1990) et de feuilles (Dubois et al., 1991) provenant de plantules cultivées *in vitro*. Des études cytologiques ont démontré l'origine directe et unicellulaire des embryons

somatiques. Après 10 à 12 jours de culture, les embryons se détachent plus ou moins facilement suivant l'explant utilisé et sont visibles à l'oeil nu.

L'utilisation de glycérol (330mM) au cours de la phase d'induction permet une synchronisation relative de la première division des cellules embryogènes des tissus foliaires (Robatche-Claive et al., 1992). Chez la chicorée, la première division de la cellule embryogène est symétrique et anticline par rapport à l'orientation des faisceaux conducteurs (Blervacq et al., 1995). La synchronisation obtenue améliore les conditions d'études biochimiques et moléculaires de l'embryogenèse.

4.3. Les marqueurs de l'embryogenèse somatique.

Dans les feuilles, les premières modifications cytologiques apparaissent dès le 3^{ème} jour de culture en présence du milieu inducteur. Les cellules embryogènes sont caractérisées par un cytoplasme dense et trabéculaire, un noyau central comportant un gros nucléole et des dépôts de callose pariétaux. Ces dépôts de callose au niveau pariétal pourraient entraîner l'isolement des cellules de leur environnement tissulaire et permettre l'expression du programme embryogène (Dubois et al., 1991 ; Robatche-Claive et al., 1992). Après 7 à 10 jours de culture, les embryons globulaires dépourvus de protoderme présentent à leur surface une matrice extracellulaire de nature lipo-glycoprotéique (Dubois et al., 1990 ; Dubois et al., 1992).

Hormis le dépôt de callose pariétal, d'autres marqueurs précoces ont été mis en évidence lors de l'induction de l'embryogenèse somatique chez le *Cichorium* hybride "474". L'évolution de la synthèse protéique au cours de l'embryogenèse somatique dans les tissus foliaires a été analysée par électrophorèse bidimensionnelle en gel de polyacrylamide. Des changements quantitatifs et qualitatifs dans la synthèse protéique ont ainsi été détectés au cours de l'acquisition de la compétence embryogène. La plupart des modifications sont visualisées dès le 3^{ème} jour de la phase d'induction. La présence de 15 polypeptides semble plus particulièrement reliée à l'acquisition de la compétence à l'embryogenèse (Boyer et al., 1993). Une étude similaire réalisée dans des tissus racinaires soumis aux conditions d'embryogenèse somatique a permis de détecter 12 polypeptides dont la présence est reliée à l'embryogenèse somatique, dont 3 ont les mêmes poids moléculaire et pHi que 3 des polypeptides détectés dans les tissus foliaires (Boyer et al., 1994). Plus particulièrement, 2 protéines acides de 38 kDa sont accumulées lors de la phase d'induction et leur présence persiste durant la formation des embryons somatiques. Leur apparition est reliée à l'embryogenèse somatique, puisque ces 2 protéines sont détectées chez l'hybride "474" et chez une autre lignée embryogène alors qu'elles ne sont pas détectées chez une lignée non embryogène soumise aux mêmes conditions de culture (Hilbert et al., 1992).

La température est l'un des facteurs déterminants dans l'orientation de la morphogenèse au cours de la culture. Une température de 35°C favorise la formation des embryons somatiques, alors qu'une température de 25°C permet d'obtenir majoritairement des bourgeons adventifs (Decout et al., 1994). Deux polypeptides de 17 kDa sont détectés dans les tissus à partir du 5^{ème} jour de la culture réalisée à 35°C, et sont absents de la culture réalisée à 25°C. Leur présence est donc reliée à l'orientation des tissus vers la voie embryogène. Un autre polypeptide de 22 kDa apparaît après 3 jours de culture à 35°C et après 8 jours de culture à 25°C, ce qui coïncide à cette dernière température avec la formation tardive de quelques embryons somatiques. Identifié comme une protéine de choc thermique (HSP pour Heat Shock Protein), il apparaît également lors de la culture de variétés non embryogènes soumises aux mêmes conditions (Decout, 1998).

Une corrélation a été établie entre le contenu en polyamines libres et l'embryogenèse somatique chez l'hybride "474". Le DFMA (α -difluorométhylarginine) est un inhibiteur de l'arginine décarboxylase, enzyme impliqué dans la voie de synthèse des polyamines. Son addition au cours de la culture entraîne une diminution importante du contenu en polyamines libres des échantillons foliaires, mais aussi une réduction importante du pouvoir embryogène qui est divisé par 6. Cet effet peut être réversé par l'ajout d'une polyamine exogène, la putrescine.

L'inhibition de l'embryogenèse somatique observée s'accompagne de modifications mineures dans les profils polypeptidiques tissulaires. Trois polypeptides de 17 kDa, qui semblent reliés à la différenciation des embryons somatiques, ne sont pas synthétisés en présence de DFMA. Par contre, l'ajout de cet inhibiteur n'affecte pas la présence dans les tissus des 2 polypeptides de 38 kDa reliés à l'acquisition de la compétence embryogène. En condition de culture standard, ces polypeptides de 38 kDa détectés dans les tissus foliaires sont sécrétés au cours de l'embryogenèse somatique. Si l'ajout de DFMA ne modifie pas leur synthèse dans les tissus, il induit cependant une diminution remarquable de l'excrétion de ces polypeptides dans le milieu de culture. L'excrétion de ces polypeptides semble donc corrélée à l'embryogenèse somatique (Helleboid et al., 1995). Ces polypeptides ont été identifiés comme des β -1,3-glucanases. Colocalisées avec la callose au niveau de la paroi de la cellule embryogène, elles interviendraient dans la dégradation de ce composé. D'autres protéines, des chitinases de 32 kDa et une protéine osmotin-like de 25 kDa sont également excrétées au cours de l'embryogenèse. Par RT-PCR et RACE-PCR, un ADNc codant pour une β -1,3-glucanase de 38 kDa a été isolé. L'ARNm correspondant est transcrit à partir du 3^{ème} jour de culture chez l'espèce embryogène, avec un taux maximum lors de la division des cellules embryogènes. Il n'est pas détecté chez un témoin non embryogène soumis aux mêmes conditions de culture (Helleboid, 1998).

Par criblage différentiel d'une banque d'ADNc réalisée à partir des ARNm polyadénylés transcrits au 3^{ème} jour d'induction, un ADNc codant pour une hémoglobine non symbiotique a été isolé. L'analyse de son expression par Northern blot révèle une transcription spécifique durant l'étape d'induction de l'embryogenèse somatique. Chez une chicorée non embryogène soumise aux mêmes conditions de culture, ce gène n'est pas transcrit. Ces résultats suggèrent que son expression n'est pas due au stress ou aux conditions de culture appliquées, mais qu'elle est liée aux étapes précoces de l'embryogenèse somatique (Hendriks et al., 1998).

4.4. Avantages et limites du modèle chicorée dans le contexte de l'étude proposée.

Nous proposons dans ce travail d'appréhender les mécanismes moléculaires précoces de l'embryogenèse somatique chez la chicorée hybride "474", en caractérisant des gènes dont l'expression serait corrélée à la mise en place de ce processus morphogène. De par les caractéristiques de l'embryogenèse qu'il développe, notre système biologique semble adapté à l'étude proposée. Toutefois, il faut également tenir compte de certaines de ses limites, qui sont pour la plupart inhérentes au génotype de la plante modèle.

Comme nous l'avons précédemment souligné, la chicorée hybride "474" présente une embryogenèse directe et d'origine unicellulaire. Les embryons sont obtenus directement à partir des cellules somatiques des explants végétaux ; l'absence de multiplication cellulaire inorganisée intermédiaire favorise l'étude des phénomènes précoces de l'embryogenèse somatique. De plus, lorsque l'embryogenèse somatique est initiée sur des fragments foliaires, l'adjonction de glycérol au milieu de culture permet d'obtenir une synchronisation relative de la 1^{ère} division des cellules embryogènes. Cette particularité améliore les conditions d'études au niveau moléculaire, puisqu'elle permet l'obtention d'un maximum de cellules au même stade d'évolution vers la voie embryogène, et donc par extrapolation elle permet de corréler les modifications observées dans l'expression des gènes à des étapes précises de la mise en place de l'embryogenèse somatique. Toutefois, seules 4% des cellules en moyenne évoluent vers la voie embryogène. L'utilisation de techniques d'analyse très sensibles sera nécessaire pour mettre en évidence des transcrits en relation avec l'embryogenèse, du fait de leur faible représentation au sein des ARN totaux.

Ces caractéristiques rendent le *Cichorium* hybride "474" attractif pour une étude de l'embryogenèse somatique au niveau moléculaire. Cependant l'interprétation des résultats peut se révéler difficile, du fait du génotype même de la plante utilisée.

Le *Cichorium* hybride "474" provient d'un croisement interspécifique, ce qui implique l'existence d'une hétérozygotie pour de nombreux caractères. Ainsi, la présence d'allèles différents pour un même locus pourrait compliquer l'analyse des résultats d'ordre moléculaire.

Par ailleurs, nous ne disposons pas de données d'ordre génétique. L'hybride "474" est très peu fertile, ce qui rend l'établissement de descendance difficile. La mise en place de ces descendance devrait permettre une analyse de la ségrégation du caractère embryogène. L'absence des parents et de mutant de ce génotype nous amène à utiliser un *Cichorium* génotypiquement plus éloigné de la chicorée "474" comme témoin non embryogène dans nos conditions de culture. Il s'agit d'un *Cichorium intybus* var. *sativum* cv. Pévèle.

5. CONCLUSIONS.

Dans cette analyse bibliographique, nous avons voulu faire un état des connaissances actuelles sur les mécanismes moléculaires de l'embryogenèse somatique. Il apparaît que les principales études de l'embryogenèse somatique ont été effectuées sur des plantes présentant une embryogenèse indirecte et pour lesquelles la caractérisation biochimique et moléculaire de la phase d'induction reste difficile.

Chez la chicorée, l'embryogenèse somatique initiée dans des fragments foliaires est directe et d'origine unicellulaire. Ces caractéristiques ont permis la mise en évidence de modifications dans la synthèse protéique et l'accumulation de transcrits en relation avec l'induction de l'embryogenèse somatique, bien avant la formation des embryons. Le *Cichorium* hybride "474" constitue donc un nouveau modèle d'étude des mécanismes d'acquisition de la compétence à l'embryogenèse somatique. Conscients de ses limites, nous tenterons une approche moléculaire en utilisant des techniques sensibles que nous adapterons au matériel végétal dont nous disposons.

DEUXIEME PARTIE

MATERIEL ET METHODES

MATERIEL ET METHODES

1. MATERIEL VEGETAL ET CONDITIONS DE CULTURE.

1.1 Matériel végétal.

1.1.1 Le *Cichorium* hybride "474".

Le *Cichorium* hybride "474" provient d'un croisement entre le *Cichorium intybus* var. *sativum* et le *Cichorium endivia* var. *latifolia*.

Sa systématique est la suivante :

Embranchement des Spermaphytes
Sous-embranchement des Magnoliophytinées
Division des Magnoliophytes
Classe des Magnoliopsides
Sous-classe des Astéridées
Ordre des Astérales
Famille des Astéracées
Genre *Cichorium*

L'étude proposée concerne l'embryogenèse somatique initiée sur des feuilles de plantules du *Cichorium* hybride "474" cultivées *in vitro*, car il est possible, à partir de ces tissus, d'obtenir une synchronisation de la première division des cellules embryogènes.

1.1.2. La chicorée "Pévèle".

Nous avons utilisé comme témoin négatif un *Cichorium intybus* var. *sativum* cv Pévèle. Cette chicorée n'est pas embryogène dans les conditions de culture utilisées pour permettre l'obtention d'embryons somatiques chez la chicorée "474".

1.2. Le milieu de culture utilisé.

L'embryogenèse chez la chicorée "474" s'effectue dans un milieu liquide de Murashige et Skoog (1962) modifié, dilué au demi, dont le pH est ajusté à 5,4. Sa composition est donnée en annexe (Tableau 1). Ce milieu de base M₁₇ sera à la fois utilisé pour la multiplication *in vitro* du *Cichorium* par embryogenèse somatique, et pour l'obtention d'embryons somatiques à partir des feuilles provenant de plantules produites *in vitro*. Tous les constituants des milieux de culture sont autoclavés à 110°C pendant 20 minutes. Seuls les phosphates (KH₂PO₄) sont autoclavés séparément pour éviter toute précipitation.

1.3. Obtention de plantules de *Cichorium* "474".

Les feuilles utilisées lors de cette étude proviennent de vitroplants âgés de 6 semaines, issus de la conversion d'embryons somatiques obtenus à partir de racines (Dubois et al., 1990).

Les racines de plantules cultivées *in vitro*, âgées de 6 à 8 semaines, sont excisées et mises en culture dans 20 ml de milieu M₁₇ additionné de saccharose à 15 g.l⁻¹ (milieu M₁₇S₁₅, tableau 1 en annexe). La culture agitée est réalisée à 35°C et à l'obscurité. Dix jours plus tard, les racines sont transférées dans un milieu liquide de Heller (1953), à 5 g.l⁻¹ de saccharose (milieu H₅), et la culture agitée est cette fois réalisée à la lumière durant 5 jours. La composition du milieu de Heller est donnée en annexe (tableau 2). Les embryons, alors chlorophylliens, sont repiqués en boîtes de Pétri, puis en tubes, sur un milieu H₅ solide à 6 g.l⁻¹ d'agar (figure 1). Après un séjour de 6 semaines sur ce milieu, dans les conditions environnementales appropriées (chambre climatisée, 10 heures de lumière à 25°C et 14 heures d'obscurité à 20°C), les feuilles des plantules obtenues peuvent être utilisées pour l'étude de l'embryogenèse en condition synchronisée, les racines permettant quant à elles de produire à nouveau des vitroplants suivant la méthode précédemment décrite.

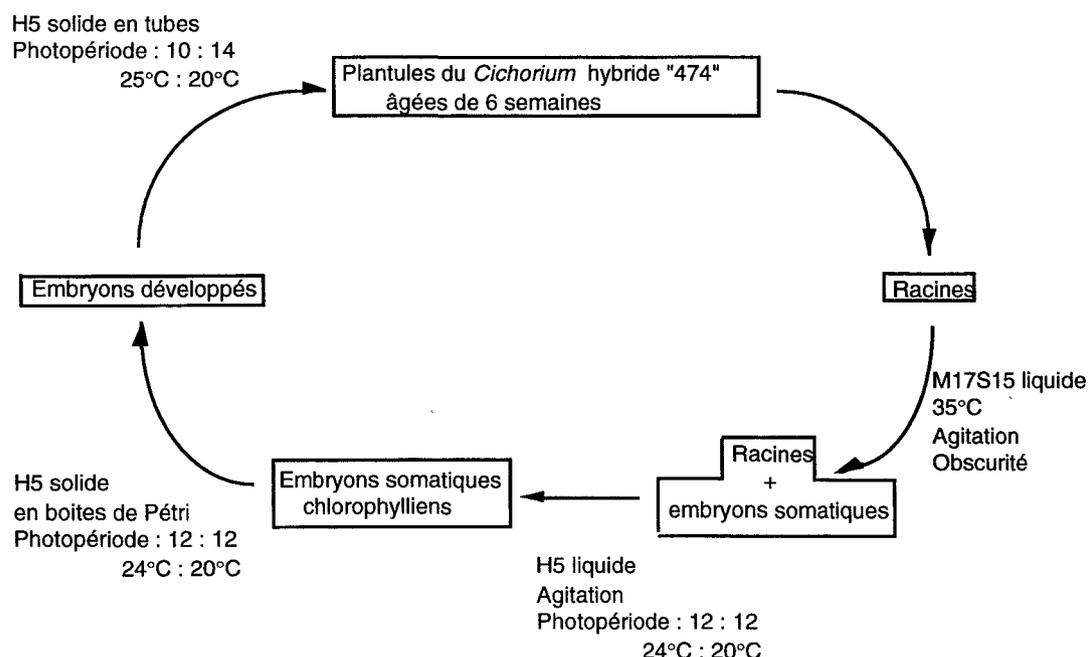


Figure 1 : Multiplication *in vitro* du *Cichorium* hybride "474" par embryogenèse somatique.

Chaque année, des plantules sont acclimatées, vernalisées et mises en pleine terre pour obtenir une montée à fleurs. Les styles appartenant à des boutons immatures sont utilisés pour régénérer des embryons somatiques, qui constituent un nouveau matériel

Chaque année, des plantules sont acclimatées, vernalisées et mises en pleine terre pour obtenir une montée à fleurs. Les styles appartenant à des boutons immatures sont utilisés pour régénérer des embryons somatiques, qui constituent un nouveau matériel initiateur (Dubois et al., 1988). Les plantules obtenues suivent alors le cycle de multiplication *in vitro*, permettant de maintenir tout au long de l'année la production de matériel végétal disponible.

1.4. Embryogenèse somatique à partir des feuilles de plantules de *Cichorium* hybride "474".

La culture se déroule en deux phases (Figure 2).

- Première phase de culture : induction de l'embryogenèse.

Les feuilles des plantules de *Cichorium* sont découpées en trois fragments d'environ 1 cm², qui sont mis en culture dans 20 ml d'un milieu M₁₇S₂₀, additionné de glycérol bidistillé stérile à la concentration finale de 330 mM (milieu M₁₇S₂₀ + gly). Le glycérol permet une synchronisation relative de la phase d'induction en retardant la division des cellules induites. Cette culture, réalisée en Erlenmeyers de 50 ml, dure 5 jours à 35°C, à l'obscurité et sous agitation constante (70 rpm).

- Deuxième phase de culture : expression de l'embryogenèse.

Au cinquième jour de culture, les fragments foliaires sont transférés dans 20 ml de milieu M₁₇S₂₀ neuf, dépourvu de glycérol, ce qui permet la division des cellules induites et le développement des embryons somatiques. Les mêmes conditions de culture sont appliquées. Au cours de cette étape, d'autres cellules sont à leur tour induites, mais de façon asynchrone.

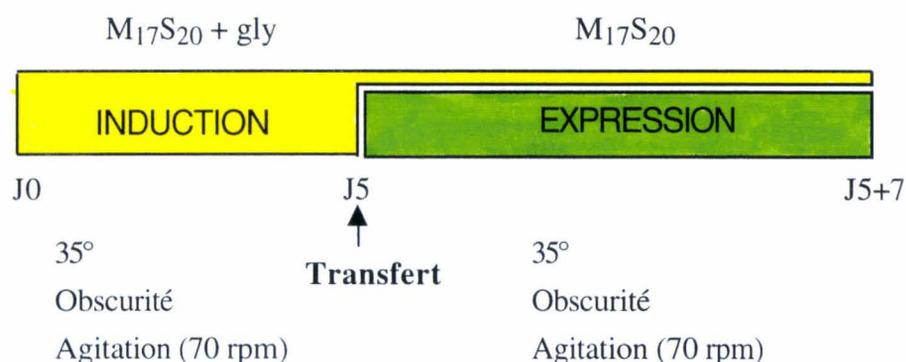


Figure 2 : Cinétique d'obtention des embryons somatiques à partir de fragments foliaires de plantules du *Cichorium* hybride "474".

1.5. Récolte du matériel végétal.

Le matériel végétal est prélevé à chacun des jours de la phase d'induction (J0, J1, J2, J3, J4, J5) et au troisième jour de la phase d'expression (J5+3). Les échantillons sont rapidement congelés à l'azote liquide et stockés à -70°C. Un témoin J5+7 est réalisé, il permet de vérifier après coloration au lugol le bon déroulement de la culture par comptage des embryons au microscope photonique.

2. COUPES CYTOLOGIQUES EN PARAFFINE.

Des fragments foliaires prélevés après 3, 4, et 5 jours de culture sont fixés dans du FAA (formol 6,5%, acide acétique 3,5% dans de l'éthanol 50%) pendant au moins 48 heures. Le fragment subit ensuite une déshydratation dans une série de solutions d'éthanol de concentration croissante, puis est imprégné de xylène avant de passer dans 2 bains successifs de paraffine.

Les fragments sont déposés au fond d'un moule rempli de paraffine de point de fusion 53-55°C (Merck). Les blocs obtenus sont débités en coupes sériées de 8 µm, et collées sur des lames par une solution de gélatine à 0,1%. Après séchage, les coupes sont déparaffinées dans du xylène et subissent une double coloration :

- Safranine à 0,1% dans une solution d'éthanol à 50%, pendant une nuit.
- Fast green à 0,5% dans l'éthanol absolu, pendant 10 secondes.

Les coupes sont alors montées dans du baume du Canada.

3. ANALYSE DES PROTEINES TISSULAIRES SYNTHETISEES DE NOVO.

3.1. Marquage *in vivo*.

Les fragments foliaires de chacun des jours de la cinétique sont mis à incuber 4 heures dans le milieu dans lequel ils ont été cultivés, additionné de 10 µl de [35S]-méthionine (37 MBq, 1mCi) dans les mêmes conditions que celles préalablement décrites (§ 1.4), puis congelés à l'azote liquide et conservés à -70°C.

3.2. Extraction des protéines.

L'extraction des protéines est réalisée selon le protocole décrit par Boyer et al. (1993), avec quelques modifications. Après broyage dans un mortier en présence d'azote liquide, le matériel végétal est resuspendu dans 1 ml de tampon de précipitation des protéines préconisé par Zivy (1986) [Acide trichloroacétique (TCA) 10% (p/v), β -mercaptoéthanol 0,07% (v/v) dans de l'acétone froid].

Après précipitation des protéines à -20°C pendant 45 minutes, les extraits sont centrifugés 20 minutes à 30000 g à 4°C et le surnageant est éliminé. Une seconde précipitation de 45 minutes dans la même solution est nécessaire pour éliminer un maximum de pigments et autres composés phénoliques. Après centrifugation dans les mêmes conditions, le culot est repris dans 1 ml de β -mercaptoéthanol à 0,07% (v/v) dans de l'acétone froid, agité à l'aide d'un vortex puis remis à précipiter à -20°C pendant 45 minutes. Après centrifugation, la précipitation est renouvelée pendant une nuit, pour éliminer l'excès de TCA qui pourrait nuire à la resolubilisation des protéines et à la migration électrophorétique. Après une centrifugation, le culot est placé sous une hotte aspirante afin d'évaporer l'acétone résiduel. Les protéines sont ensuite resolubilisées dans du tampon de lyse "UKS" (Zivy, 1986, tableau 3 en annexe), à raison de 60 $\mu\text{l}/\text{mg}$ de matière sèche. Après 2 heures de solubilisation à 22°C , une centrifugation (30000 g, 20 min., 22°C) permet de recueillir les protéines dans le surnageant. Elles sont conservées à -70°C .

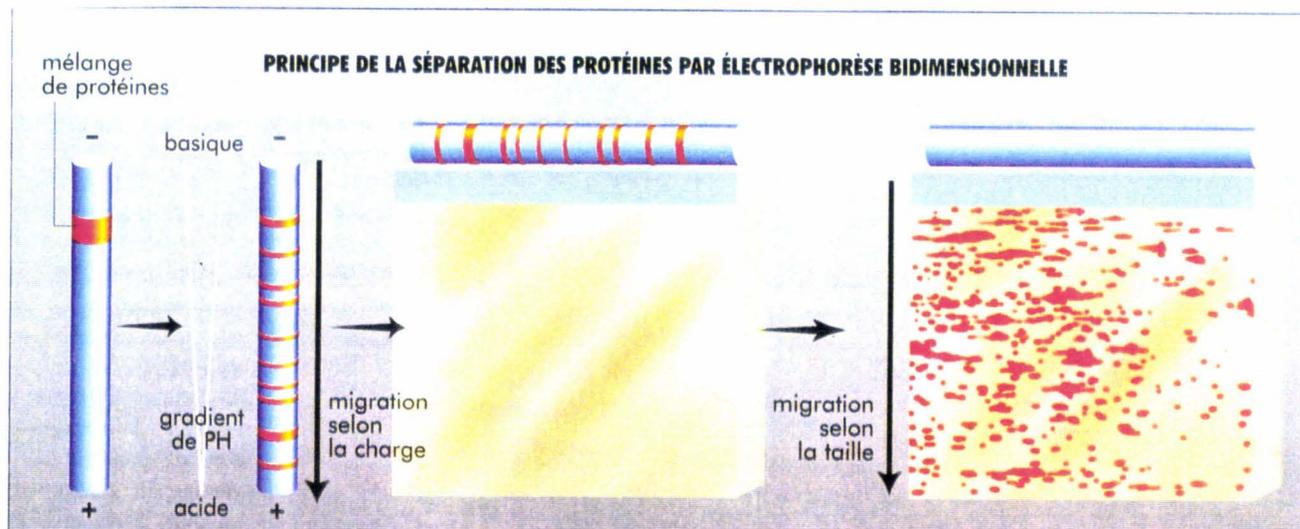
3.3. Dosage de la radioactivité incorporée.

La quantité de radioactivité incorporée dans les protéines néosynthétisées est appréciée par un comptage en scintillation liquide de la fraction insoluble dans le TCA (spectromètre Beckman, modèle LS 2800). Un aliquot de 2 μl de l'extrait protéique est prélevé et mis à incuber 10 minutes à 37°C en présence de 98 μl d'une solution de NaOH 0,1 M, H_2O_2 2 % (v/v). Après addition de 900 μl d'un mélange TCA (acide trichloroacétique) 25% (p/v), hydrolysate de caséine 2% (p/v), le mélange est laissé à 4°C pendant une heure. Les protéines précipitées sont recueillies par filtration sous vide sur un filtre GFC (Whatman). Ce dernier est rincé par 4 x 1 ml d'une solution de TCA 5% glacé et 3 ml d'acétone, puis séché sous une hotte aspirante. Le filtre est transféré dans une fiole contenant 15 ml de liquide de scintillation (Aqua luma gel), la quantité de radioactivité incorporée *de novo* est alors estimée grâce au compteur.

3.4. Séparation des protéines par électrophorèse bidimensionnelle.

Cette technique permet la séparation des protéines suivant deux paramètres indépendants :

- leur charge électrique, durant l'isoélectrofocalisation (IEF).
- leur masse moléculaire, au cours de l'électrophorèse en présence de SDS : SDS-PAGE.



3.4.1. La première dimension ou isoélectrofocalisation.

Principe.

Sous l'action d'un courant électrique, les protéines dénaturées par l'urée migrent dans un gradient de pH préétabli, et s'arrêtent lorsque leur charge nette s'annule, c'est-à-dire au pH correspondant à leur point isoélectrique (pI).

Réalisation.

L'IEF est réalisée en gels cylindriques de polyacrylamide préparés dans des tubes en verre de 15 cm et de 1,5 mm de diamètre interne.

Après addition de 20 μ l d'APS à 10 % et de 4 μ l de TEMED qui permettront sa polymérisation, la solution de gel (tableau 4 en annexe) est versée au fond d'une éprouvette, dans laquelle sont placés les tubes. De l'eau distillée, ajoutée à la solution de gel, permet ensuite le remplissage des tubes par capillarité, jusqu'à 3 cm du bord supérieur. Après une heure de polymérisation, 12 tubes sont installés sur le système de fixation d'une cuve Protean II (BIO-RAD). La partie supérieure laissée vide est complétée par 20 μ l de tampon de lyse "UKS", et 20 μ l du même tampon dilué au demi.

Pendant la polymérisation du gel, les solutions d'électrodes, acide phosphorique 10 mM pour l'anode et soude 20 mM pour la cathode, sont préparées; la solution de NaOH

est dégazée au moins 40 minutes pour éliminer le gaz carbonique qu'elle renferme, qui pourrait nuire à la bonne formation du gradient de pH.

Une préfocalisation d'une heure est réalisée pour permettre l'établissement du gradient de pH dans le gel (3 W, voltage limité à 1200 volts, intensité non limitée). Aux échantillons protéiques solubilisés dans le tampon "UKS" sont ajoutés 5 µl de bleu de bromophénol.

Chaque échantillon déposé au sommet du gel renferme une quantité de protéines radioactives présentant une scintillation de 400000 cpm.

L'isoélectrofocalisation est réalisée pendant 17 heures dans les mêmes conditions que la préfocalisation, et se poursuit 30 minutes à une tension de 1500 volts.

La migration terminée, les gels sont démoulés par pression à l'aide d'une seringue remplie d'eau et stockés à - 70°C dans 500 µl de tampon d'équilibration (Tris HCl 0,5M pH6,8, SDS 2,3% (p/v)) additionné de 50 µl d'une solution de bleu de bromophénol à 0,05 % (p/v). Ce composé coloré permettra de suivre le front de migration des protéines lors de la deuxième dimension.

3.4.2. La deuxième dimension, réalisée en présence de SDS.

Principe.

Le SDS masque les charges propres des protéines et leur confère la même charge électrique négative. La séparation s'effectue alors uniquement en fonction de leur masse moléculaire relative.

Réalisation.

Après décongélation des gels de première dimension, le tampon d'équilibration est éliminé. Le gel d'IEF est déposé au sommet d'un gel de séparation à 12,5 %, (dont la composition est donnée en annexe, tableau 5), coulé sur une hauteur d'environ 155 mm entre 2 plaques de verre de 180 x 160 mm, d'une épaisseur de 1 mm.

Les plaques sont fixées sur un support, l'ensemble est placé dans une cuve BIO-RAD Protean II, contenant du tampon de migration de Laemmli (Laemmli, 1970) modifié par Hochstrasser (Hochstrasser et al., 1988) (tableau 6 en annexe). Les gels sont eux-même recouverts de ce tampon.

Le voltage est limité à 350 volts. La migration dure environ 2 heures, la température est régulée par un système de refroidissement.

3.4.3. Révélation des protéines au bleu de Coomassie.

Pour apprécier rapidement le bon déroulement de la migration, sans interférer avec la révélation ultérieure par autoradiographie, les protéines sont révélées au bleu de Coomassie.

Fixation et coloration :

La coloration dure une nuit dans une solution de bleu de Coomassie : 100 ml de colorant (bleu de Coomassie 0,25% (p/v) dans de l'éthanol à 95 %) + 100 ml d'acide acétique 10%.

Les gels sont ensuite décolorés :

1ère décoloration : 100 ml d'éthanol 95 % + 150 ml d'acide acétique 5 %
(2 x 30 minutes).

2ème décoloration : 75 ml d'éthanol 95 % + 175 ml d'acide acétique 5 %
(2 x 30 minutes).

3ème décoloration : 50 ml d'éthanol 95 % + 200 ml d'acide acétique 5 %
(2 x 30 minutes).

3.4.4. Séchage des gels.

Après un passage de 30 minutes dans de l'Amplify (Amersham) qui augmente la scintillation de la radioactivité incorporée, les gels sont déposés sur un papier (Whatman 3M), recouverts d'un film de cellophane (Saran) et placés dans le sécheur de gels après élimination des bulles d'air. Le gel est séché en 2 heures sous l'action conjuguée du vide et d'une température élevée (80 °C), dans un sécheur de gels (Modèle 543 Gel Dryer BIO-RAD).

3.4.5. Autoradiographies.

Le séchage terminé, le film de cellophane est enlevé et le gel est placé en contact avec un Hyperfilm-βmax (Amersham) dans une cassette métallique et laissé à température ambiante pendant 3 semaines.

3.5. Analyse informatique des gels.

L'analyse et la comparaison des autoradiographies sont réalisées à partir d'une station de travail Sun Sparestation 20. Les films autoradiographiques sont numérisés grâce à un scanner Sharp JX 330, et analysés avec le logiciel 2-D Analyser (BioImage).

4. EXTRACTION ET PURIFICATION DES ARN MESSAGERS.

4.1. Précautions.

L'extraction et la purification des ARN messagers requièrent des précautions particulières pour éviter toute dégradation des ARN par les ribonucléases. Les mortiers et la verrerie nécessaires à l'extraction, l'eau ultrapure (fournie par le système Millipore) et les solutions utilisées sont traités pendant une nuit par un inhibiteur puissant des ribonucléases, le DEPC (Diéthyl pyrocarbonate) ou le DMPC (Diméthyl pyrocarbonate) utilisés à 0,1 % (v/v), puis autoclavés à 110° pendant 20 minutes pour éliminer toute trace d'inhibiteur.

Les embouts de pipettes, les Eppendorfs sont également autoclavés; toutes les manipulations sont réalisées avec des gants.

4.2. Extraction et purification des ARN totaux.

Elles sont réalisées par la méthode à l'isothiocyanate de guanidium / chlorure de césium (Chirwing *et al*, 1979). L'isothiocyanate de guanidium est un agent chaotropique qui désintègre les structures cellulaires, dissout les protéines et permet la libération d'ARN intacts. Le β -mercaptoéthanol qui lui est associé inactive les ribonucléases par son action réductrice.

Les solutions utilisées sont préparées le jour même de l'extraction. Leur composition est donnée en annexe (tableaux 7 et 8). Les fragments foliaires sont finement broyés dans un mortier à l'aide d'un pilon en présence d'azote liquide, dans un bac réfrigéré. A la poudre qui en résulte sont ajoutés 10 ml de GIT 4 M; après homogénéisation, la solution obtenue est soumise à une centrifugation (15000 g, 10 min., 4°C) pour éliminer les débris cellulaires.

Le surnageant est prélevé et déposé à la surface de 10 ml de tampon de chlorure de césium. Une ultracentrifugation à 125000 g pendant 21 heures à 20°C permet de récupérer les ARN sous la forme d'un culot au fond du tube. Le surnageant et le gradient de CsCl, contenant les protéines et l'ADN, sont éliminés; les parois du tube sont nettoyées à l'alcool absolu. Le culot, gélatineux et translucide, est redissout à l'aide d'un Pipetman dans 300 μ l d'acétate de sodium 0,3 M. Après transfert de cet extrait dans un tube Eppendorf stérile, et addition de 2,5 V d'éthanol absolu, l'ensemble est précipité à -20°C une nuit minimum, puis centrifugé (10000 g, 5 min, 4°C). Le surnageant est éliminé, et après évaporation de l'éthanol, le culot d'ARN sec est repris dans 1 ml de tampon d'accrochage (tableau 9 en annexe).

La quantité d'ARN présents dans l'extrait est ensuite déterminée par dosage spectrophotométrique. Une unité d'absorbance à 260 nm (A260) correspond à 40 µg d'ARN/ml de solution (Maniatis et al, 1982). La présence de polysaccharides dans l'extrait d'ARN est estimée à 230 nm (A230), tandis que l'absorbance à 280 nm (A280) quantifie les contaminations protéiques. Les rapports A260/A230 et A260/A280 doivent être proches de 2 pour que l'échantillon d'ARN soit considéré pur.

4.3. Purification des ARN messagers polyadénylés.

Chez les Eucaryotes, la majorité des ARN messagers (ARNm) comportent en leur extrémité 3' une queue polyadénylée, qui n'existe pas chez les ARN ribosomiaux (ARNr) et les ARN de transfert (ARNt).

Le protocole de purification utilisera cette propriété et consistera en une chromatographie d'affinité sur colonne d'oligo-dT cellulose (Gibco BRL). La composition des tampons d'accrochage et d'éluion des ARNm est donnée en annexe (tableau 9).

Après passage d'1 ml d'une solution de NaOH 0,1 M, la colonne est équilibrée avec 4 x 1 ml de tampon d'accrochage.

Pour permettre l'accrochage des ARNm polyA⁺ sur la colonne d'oligo-dT, les ARN sont préalablement dénaturés à 70°C pendant 5 minutes et rapidement refroidis sur de la glace fondante, ce qui évite qu'ils retrouvent leur structure native. L'extrait est déposé sur la colonne, l'éluant est passé de nouveau sur la colonne afin d'accrocher un maximum d'ARNm polyadénylés (ARNm polyA⁺). Les autres ARN, non polyadénylés, ne se fixent pas sur la colonne; ils sont éliminés par passage de 4 x 1 ml de tampon d'accrochage.

Les ARNm poly A⁺ sont décrochés de la matrice chromatographique par diminution de la force ionique à l'aide du tampon d'éluion (3 x 0,5 ml) qui est dépourvu de NaCl. La quantité d'ARNm polyA⁺ obtenue est estimée spectrophotométriquement et le rendement de la chromatographie est calculé. Une seconde chromatographie sur oligo-dT cellulose peut être nécessaire. Les ARNm polyA⁺ représentent en général entre 2 et 5% des ARN totaux. Si le pourcentage obtenu est plus élevé, des ARN non polyadénylés contaminent probablement l'extrait.

Les ARNm polyA⁺ sont ensuite aliquotés, à raison de 300 µl par Eppendorf. Après addition de 18 µl de NaCl 5M et de 2,5V d'éthanol absolu, les ARNm polyA⁺ sont précipités à - 20°C pendant au moins une nuit et conservés ainsi jusqu'à leur utilisation.

Une centrifugation à 10000 g à 4°C pendant 5 minutes permet de recueillir un culot d'ARNm polyA⁺. Ce dernier est séché et redissout dans un volume adéquat d'eau stérile traitée au DEPC.

La colonne d'oligo-dT cellulose est régénérée par lavage avec 1 ml de NaOH 0,1 M, puis rinçage avec de l'eau ultrapure stérile traitée au DEPC, jusqu'à ce que le pH de l'éluant redevienne neutre. Après imprégnation par du tampon d'accrochage, la colonne est stockée à 4°C jusqu'à une utilisation ultérieure.

5. TRADUCTION *IN VITRO* DES ARNm POLYADENYLES.

Pour préciser les niveaux de régulation de l'expression des gènes lors de l'embryogenèse somatique, les ARNm polyA⁺ sont traduits *in vitro* dans un système acellulaire préparé à partir d'un lysat de réticulocytes de lapin, commercialisé par Promega.

C'est un système complet pour la traduction d'ARN exogènes. L'activité endogène a été inhibée par un traitement à la nucléase. Ce type de lysat permet la traduction *in vitro* d'ARNm codant pour des polypeptides de haut poids moléculaire, tels que ceux apparaissant chez la chicorée.

Dès sa réception, le lysat est fractionné en aliquots pour éviter toute dénaturation des complexes ribosomaux lors de congélations et décongélations successives.

5.1. Réalisation.

La préparation du complexe de traduction s'effectue sur glace; les différents composants sont additionnés comme suit, en prenant la précaution de déposer chacun des produits sans les mélanger :

- Lysat de réticulocytes de lapin : 35 µl
- Acides aminés (sans méthionine) 1 mM : 2 µl
- Acétate de potassium 5 M : 2µl
- ARNm polyA⁺ : 1 µg dans H₂O DEPC
- [³⁵S]-méthionine (37 MBq, 1mCi) : 4 µl
- H₂O DEPC q.s.p. 50 µl

Pour chaque expérience sont réalisés un contrôle négatif (sans ARN = témoin caractérisant le bruit de fond) et un contrôle positif (ARNm inclus dans le kit) permettant d'apprécier l'efficacité du kit de traduction. La traduction s'effectue en présence d'un acide aminé radioactif, la^[35S]-méthionine (37 MBq, 1mCi). Les protéines synthétisées *in vitro* seront radioactives si elles contiennent au moins un résidu méthionine.

Après centrifugation, le mélange traductionnel est incubé 90 minutes à 30°C. La réaction est arrêtée en transférant les tubes Eppendorf sur glace. Pour chaque échantillon, 2 µl sont prélevés et dosés comme les extraits résultant du marquage *in vivo* des protéines.

5.2. Analyse des produits de traduction.

Les polypeptides du mélange traductionnel sont précipités dans les mêmes conditions que les protéines tissulaires, séparés par électrophorèse bidimensionnelle et révélés au bleu de Coomassie. Les gels sont alors séchés, les produits de traduction radioactifs sont révélés par autoradiographie et les profils obtenus pour chacun des jours de la cinétique sont comparés (§ 3.2. à 3.5.).

6. TRANSCRIPTION INVERSE DIFFERENTIELLE DES ARN MESSAGERS POLYADENYLES ET AMPLIFICATION PAR PCR (DDRT-PCR = Differential Display RT-PCR).

Le "differential display", technique mise au point par Liang et Pardee (1992), permet une étude directe des modifications de l'expression génique qui interviennent au cours d'un processus biologique donné, par comparaison des populations d'ARNm polyadénylés.

Cette technique comprend trois étapes majeures :

- une transcription inverse des ARNm polyadénylés en utilisant une amorce composée de 12 thymines (T12), et en son extrémité 5' de deux nucléotides discriminants. L'amorce est de type T12VN, où V correspond à l'adénine (A), la guanine (G) ou la cytosine (C) et N à l'une des quatre bases de l'ADN. Les 12 amorces ainsi générées sont utilisées différemment.

- une amplification par PCR ("Polymerase chain Reaction") des espèces d'ADNc obtenues, en utilisant la même amorce T12VN associée à une amorce aléatoire.

- une séparation électrophorétique des fragments d'ADNc résultant de l'amplification.

L'adaptation de cette technique à notre étude est schématisée dans la figure 3.

6.1. Transcription inverse différentielle.

L'amorce (3')T12GC(5') a été choisie pour réaliser la transcription inverse à partir des ARNm polyadénylés extraits aux différents stades de l'embryogenèse préalablement définis (§ 1.5.). Au total, 12 combinaisons différentes des 2 nucléotides discriminants sont possibles (GG, GC, AG, TG, ...). La population d'ADNc obtenue représente donc en moyenne 1/12ème de la population totale d'ARNm transcrits à un stade donné.

Les ARNm précipités sont centrifugés à 10000 g à 4°C pendant 5 minutes. Le culot recueilli est séché sous vide (DNA SpeedVac® DNA110 de Savant) et redissout dans de l'eau stérile traitée au DMPC. Chaque réaction utilise 0,5 µg d'ARNm. Ils sont dénaturés pendant 5 minutes à 65°C puis refroidis sur la glace.

Les différents réactifs nécessaires à la transcription inverse proviennent d'un kit commercialisé par Promega (Reverse Transcription System). Un mélange réactionnel est réalisé pour l'ensemble des échantillons. Sa composition est donnée en annexe (tableau 10). Le complexe de transcription est ajouté aux échantillons d'ARNm et le volume est complété à 20 µl avec de l'eau stérile traitée au DMPC.

Deux témoins sont réalisés :

- Un témoin négatif, où l'ARN est remplacé par de l'eau stérile traitée au DMPC.
- Un témoin positif contenant 1 µg d'un ARN témoin fourni avec le kit de transcription inverse.

La réaction s'effectue à 42°C pendant 1 heure. Les produits obtenus sont conservés à -20°C.

POPULATION TOTALE D'ARN_m POLYADENYLES

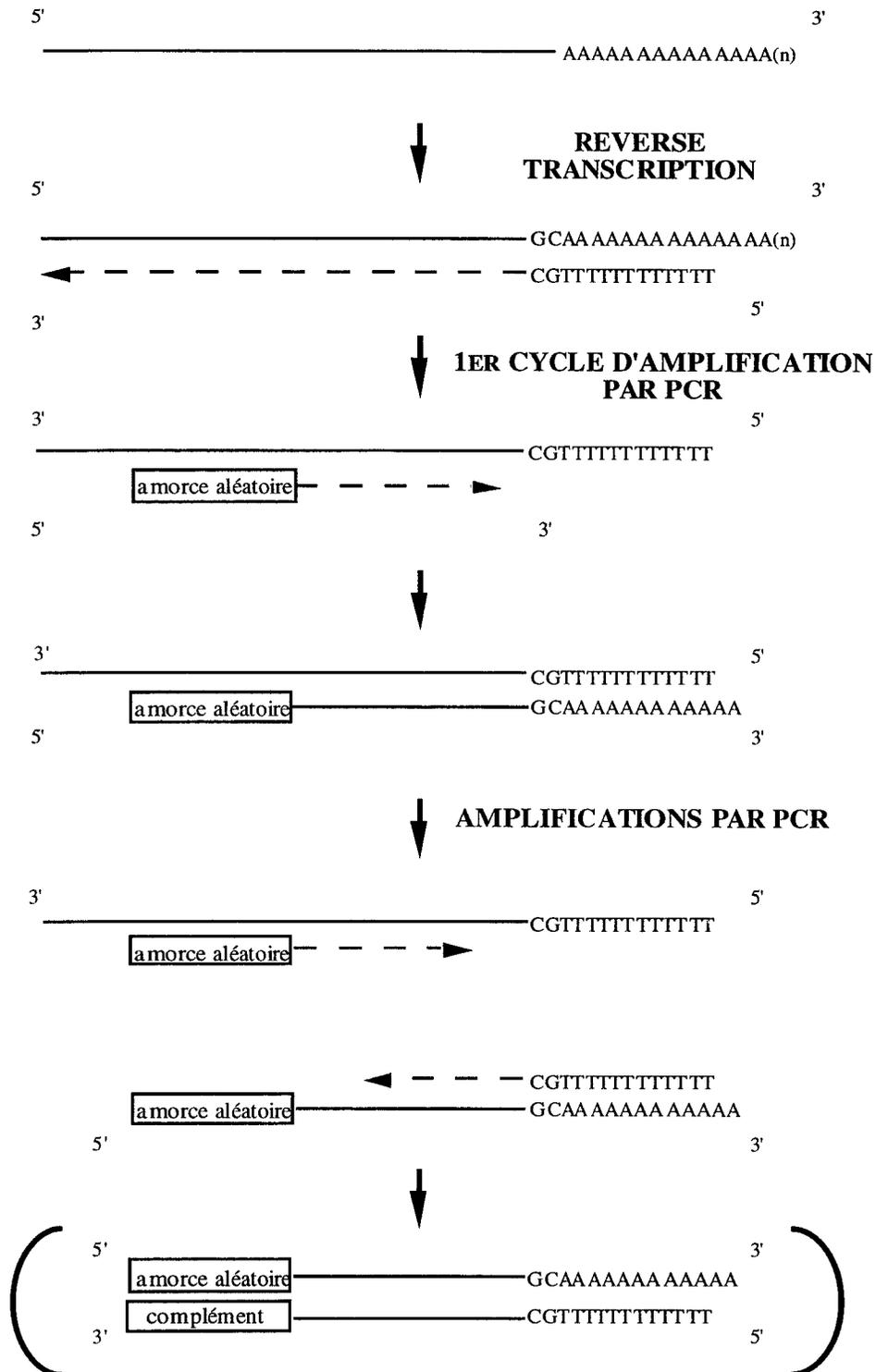


Figure 3 : Principe du DDRT-PCR.

6.2. Amplification par PCR.

La PCR permet d'amplifier rapidement et de façon exponentielle des séquences d'ADN double brin en utilisant deux amorces, l'une s'hybridant en 3' du premier brin et l'autre en 3' du deuxième brin.

La population d'ADNc simple brin obtenue après transcription inverse différentielle est amplifiée par PCR. La première amplification, permettant d'obtenir des ADNc double brin, est réalisée grâce à une amorce aléatoire composée de dix nucléotides, qui s'hybride en 3' du premier brin, où se trouve une séquence complémentaire. Les amplifications ultérieures utilisent en combinaison l'amorce T12GC et l'amorce aléatoire. Vingt amorces aléatoires appartenant à un kit commercialisé par Operon Technologies (kit B) ont été testées en combinaison avec l'amorce T12GC. La liste des amorces est donnée en annexe (tableau 11).

Avant amplification, les produits de la transcription inverse sont dilués au 1/50^{ème} dans de l'eau stérile.

Pour une meilleure reproductibilité, les différents composants sont réunis dans un mélange réactionnel, préparé pour le nombre total d'échantillons. Sa composition est donnée en annexe (tableau 12). Un volume de 20 µl de mélange réactionnel sont déposés dans un tube ThermowellTM Costar®, 5 µl des produits de reverse transcription dilués sont ajoutés. Un témoin contenant 20 µl du mélange réactionnel et 5 µl d'eau stérile permet de vérifier l'absence d'ADN contaminant. La PCR se déroule dans un Thermocycler GeneAmp PCR System 2400 de Perkin Elmer. Les différentes étapes sont résumées dans la figure 4.

Après une dénaturation initiale à 92,5°C pendant 4 minutes, l'amplification se déroule sur 35 cycles, chacun comprenant les étapes suivantes :

- Dénaturation : 92,5°C, 1 min.
- Hybridation des amorces : 42°C, 1 min.
- Elongation : 72°C, 2 min.

Après une élongation finale à 72°C pendant 6 minutes, les échantillons sont conservés temporairement à 4°C, ou congelés à -20°C.

Des réactions de PCR sont également réalisées directement sur les ARNm, de façon à vérifier l'absence d'ADN génomique contaminant.

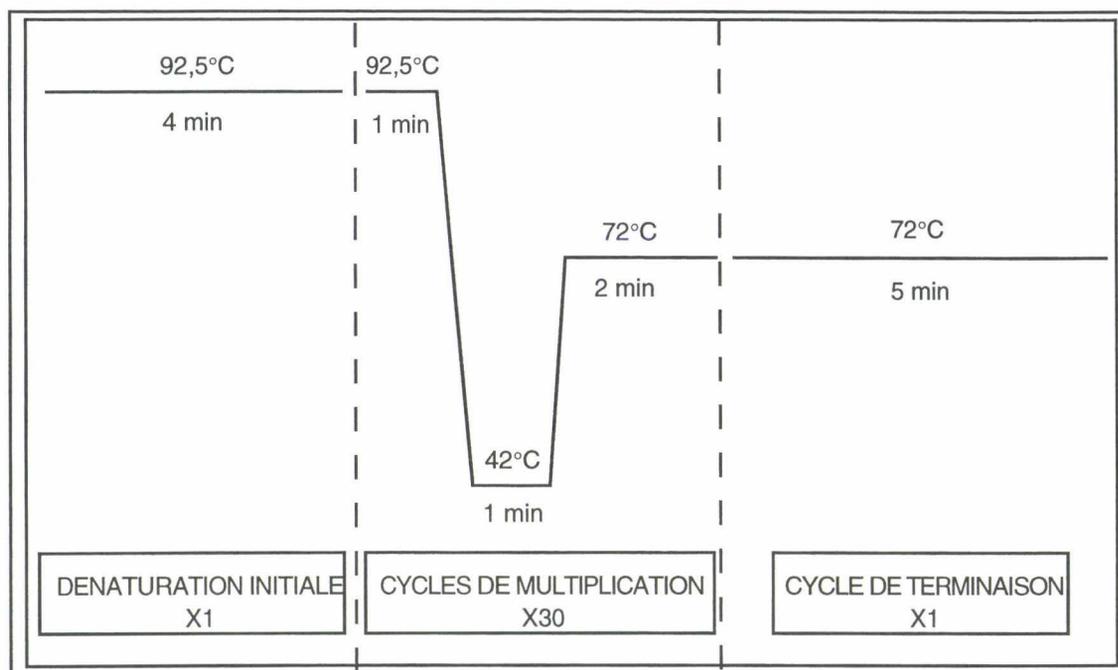


Figure 4 : Cycles thermiques utilisés pour le DDRT-PCR des ARNm.

6.3. Séparation et révélation des ADNc.

6.3.1. En gel d'agarose.

Les produits de DDRT-PCR sont séparés selon leur taille par électrophorèse horizontale en gel d'agarose à 1,2% dans un tampon TBE 0,5X (composition donnée en annexe, tableau 13), contenant du bromure d'éthidium à 0,5 µg/ml de gel. Aux 25 µl des différents échantillons sont ajoutés 5 µl d'un tampon de charge 6X concentré (bleu de bromophénol 0,25%, saccharose 40%). Les échantillons ainsi qu'un marqueur de poids moléculaire (1 kb Ladder, Gibco BRL) sont déposés dans les puits. L'ADN chargé négativement migre vers l'anode, entraîné par un champ électrique conduit par le tampon TBE 0,5X, dont le gel est recouvert. Le bleu de bromophénol contenu dans le tampon de charge permet de suivre la migration, qui est réalisée à un voltage constant de 100 volts. Le bromure d'éthidium, agent mutagène, s'intercale entre les bases nucléiques des molécules d'ADN, permettant leur visualisation sous ultra-violets.

6.3.2. En gel de polyacrylamide.

Cette électrophorèse est réalisée sur gels verticaux en plaques de 180 x 160 x1 mm. Le gel de résolution à 6% d'acrylamide où s'effectue la séparation des molécules d'ADN est recouvert d'un gel de concentration à 4% d'acrylamide qui comporte les puits

nécessaires au dépôt des échantillons. La composition des gels est donnée en annexe (tableau 14).

Au tampon de charge composé de bleu de bromophénol à 0,25% et de saccharose à 40%, du xylène-cyanol à 0,25% peut être ajouté, il migre avec les molécules de 200 pb.

L'électrophorèse est réalisée à 120 V pendant 4 ou 7 heures, suivant la séparation désirée.

Les molécules d'ADN sont révélées après coloration argentique par la méthode de Bassam *et al.* (1992) modifiée par Lohmann *et al.* (1995) (tableau 15 en annexe).

Les gels sont réhydratés dans une solution de glycérol à 10% et séchés entre deux feuilles de cellophane dans le sécheur de gels (Gel Drier, BIO-RAD), pendant 2 heures à 80°C.

7. CLONAGE DES PRODUITS DE DDRT-PCR.

7.1. Elution des ADNc des gels de polyacrylamide.

L'observation des profils obtenus sur les gels de polyacrylamide permet de sélectionner des ADNc qui s'accumulent de façon différentielle au cours de l'embryogenèse. Pour récupérer ces ADNc, les gels ne sont pas séchés. Après fixation des gels, la bande d'intérêt est découpée directement sur le gel à l'aide d'une lame de scalpel stérile; le fragment de gel est ensuite haché en petits fragments et déposé dans un microtube Costar. L'élution s'effectue selon un protocole modifié de Lohmann *et al.* (1995). Après addition de 3 µl d'eau stérile aux fragments de gel, l'ensemble est centrifugé à 15000 g pendant 10 min., à 20°C. L'échantillon est ensuite mis à bouillir pendant 2 min pour faciliter l'élution de l'ADN, puis est centrifugé à nouveau dans les mêmes conditions. Le surnageant est récupéré et dilué au 1/100ème avant d'être réamplifié par PCR, dans les conditions préalablement décrites. Cette PCR permet d'accumuler une quantité importante de l'ADNc sélectionné.

7.2. Clonage.

7.2.1. Purification des échantillons.

Les produits de PCR sont séparés sur gel d'agarose (cf §3.1.), pour vérifier l'efficacité de l'amplification et estimer la quantité d'ADNc contenu dans l'extrait. Pour cela, différentes quantités d'un ADN de concentration connue (Lambda-dam, Appligène) sont déposées lors de la migration. La partie du gel contenant la bande d'intérêt est

découpée, et l'ADNc est purifié avec le kit QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) suivant les instructions du fournisseur. L'échantillon est repris dans 20 µl de tampon T10 (Tris-HCl 10 mM pH 8,5). La quantité d'ADNc présente est estimée par dosage d'un aliquot sur gel d'agarose.

7.2.2. Ligation et clonage.

La ligation est réalisée dans un vecteur pTAg, provenant d'un kit "The ligATor plus Ligase" (R&D Systems) suivant les instructions du fournisseur. Ce vecteur permet le clonage direct de produits de PCR. La Taq polymérase ajoute un A à l'extrémité 3' des produits de PCR à la fin de la réaction. Le vecteur est linéaire et comporte un T non complétement à ses extrémités. La réaction de ligation utilise cette particularité. Pour éviter la perte des A ajoutés en 3', l'ADNc purifié est immédiatement ligué au vecteur, à raison de 0,2 pmole d'ADNc (= 50 ng pour un fragment de 500 pb) par réaction. La ligation est réalisée à 16°C pendant une nuit. Un contrôle de ligation est réalisé grâce à un insert fourni avec le kit.

La transformation de cellules bactériennes compétentes, dérivant de cellules DH1 (Stratagene), nécessite 1 µl de la réaction de ligation. Un contrôle de transformation est réalisé, avec un plasmide fourni. Après étalement et incubation à 37°C pendant 16 heures, la sélection des transformants est basée sur la couleur des colonies (sélection bleu-blanc). Chez les transformants, l'ADN exogène s'est inséré dans le gène codant pour la β-galactosidase, ce qui empêche l'obtention de la protéine fonctionnelle. Les bactéries sont cultivées en présence du substrat chromogène de la β-galactosidase, le X-Gal. Les bactéries transformées sont incapables de métaboliser ce substrat et restent blanches, alors que les bactéries non transformées sont de couleur bleue.

7.3. Séquençage.

Une minipréparation d'ADN plasmidique est réalisée sur des cultures liquides correspondant aux colonies sélectionnées (Maniatis et al., 1982). L'ADN plasmidique est ensuite digéré et la taille des inserts vérifiée sur gel d'agarose, ce qui nous permet d'éliminer les faux positifs. Une PCR, utilisant les amorces contenues aux extrémités 5' et 3' des produits de RT-PCR, est réalisée sur l'ADN plasmidique. Elle permet de vérifier l'exactitude du clonage.

Les produits clonés sont ensuite séquencés suivant la méthode de Sanger, en utilisant le kit SequiTherm™ Long-Read™ Cycle Sequencing Kit LC (Epicentre Technologies Corporation), puis soumis à un analyseur de séquence automatique LI-

COR® (LI-COR Inc.). Les réactions de séquence sont répétées de façon à éliminer les ambiguïtés pouvant exister lors de la lecture des gels.

7.4. Analyse des séquences : bioinformatique.

La figure 5 présente l'organisation des divers outils bioinformatiques utilisés pour analyser les séquences que nous avons obtenues.

7.4.1. Analyse des séquences.

Les séquences "brutes" sont corrigées à l'aide du logiciel Seqpup (<http://iubio.bio.indiana.edu>).

La séquence vectorielle est éliminée. Les séquences correspondant aux amorces utilisées sont recherchées, de façon à orienter le brin codant de l'ADNc double brin dans le sens 5'→3'. Les séquences nucléotidiques obtenues après répétitions des réactions de séquençage sont ensuite alignées par l'intermédiaire du programme MultAlin (Corpet, 1988), disponible sur le serveur Web de l'INRA de Toulouse (<http://www.toulouse.inra.fr>). Les incertitudes éventuelles peuvent alors être corrigées.

Les séquences sont ensuite traduites dans les 3 cadres de lecture possibles grâce à Seqpup.

7.4.2. Recherches d'homologies.

Les séquences nucléotidiques et protéiques sont comparées avec les séquences enregistrées dans diverses bases de données (EPLN, ESTs, SWALL, nr...), par l'intermédiaire du logiciel FASTA (Pearson et Lipman, 1988), disponible sur le serveur Web de l'"European Bioinformatics Institut" (<http://www2.ebi.ac.uk>), ou du logiciel BLASTP (Altschul et al., 1997), disponible sur le serveur du "National Center for Biotechnology Information" (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Le poids moléculaire et le point isoélectrique théoriques des protéines sont obtenus en soumettant nos séquences à l'atelier bioinformatique de l'université d'Aix-Marseille I (<http://www-biol.univ-mrs.fr>).

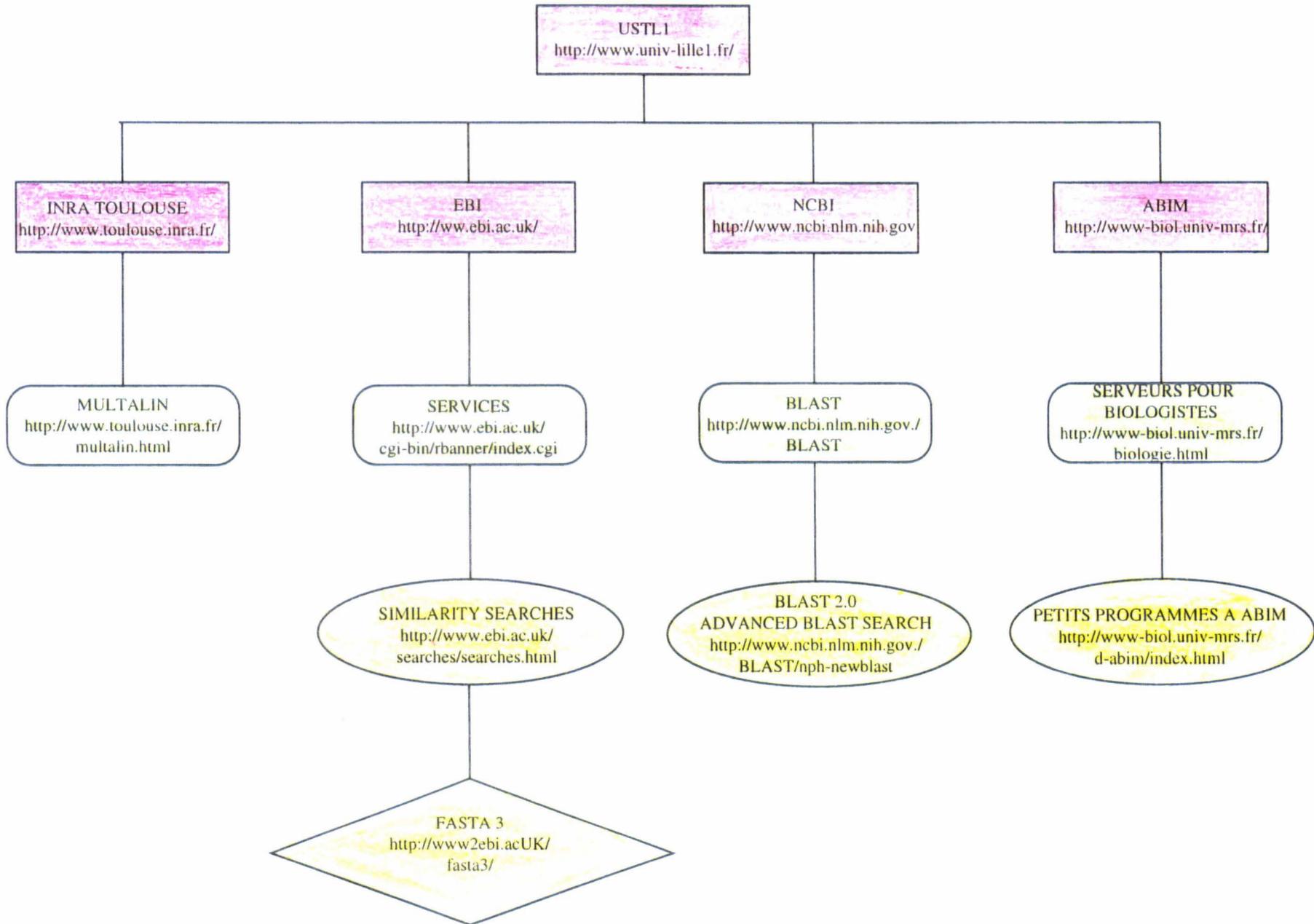


Figure 5 : organisation des services et des logiciels bioinformatiques utilisés.
 Les serveurs apparaissent en rouge, les services apparaissent en vert et leurs divisions en jaune.

8. VERIFICATION DE L'ACCUMULATION DES PRODUITS CLONES.

8.1. Hybridation des produits de DDRT-PCR avec les produits clonés.

Un sixième des produits obtenus par DDRT-PCR est séparé par électrophorèse en gel d'agarose, et transférés par capillarité sur une membrane de nylon (GeneScreen, Dupont). Les produits sont fixés pendant 2 heures à 80°C.

Les sondes sont réalisées à partir des produits de DDRT-PCR clonés et réamplifiés par PCR, en utilisant les éléments du kit T7 Quick Prime (Pharmacia), auxquels sont ajoutés 4 µl de [α^{32} P] dCTP (3000 Ci/mmol). Elles sont purifiées sur des colonnes de Séphadex G50. Les membranes sont préhybridées pendant une nuit à 42°C dans une solution de formamide désionisée 50%, SSC 5X, Denhardt 1X, SDS 0,2%, tampon phosphate de sodium 20 mM pH6,8 et ADN de sperme de hareng à 200 µg/ml. L'hybridation est réalisée à 42°C pendant une nuit dans la même solution, supplémentée de dextran sulfate à 10% (p/v), à laquelle est ajoutée la sonde dénaturée. Les rinçages sont réalisés à 42°C, en utilisant des solutions de SSC de moins en moins concentrées, contenant du SDS à 0,1%. Les membranes sont exposées contre un film autoradiographique HyperfilmTM (Amersham); le film est révélé dans la journée.

8.2. Northern blot.

Le gel dénaturant et le tampon de solubilisation des ARN sont réalisés suivant le protocole décrit par Stratagene. La séparation s'effectue sur un gel d'agarose à 1%, contenant du formaldéhyde. La migration est réalisée dans un tampon MOPS 1X. Du BET est ajouté aux échantillons, ce qui permet de vérifier le bon déroulement de l'électrophorèse et l'efficacité du transfert des ARN sur la membrane de nylon. Le transfert par capillarité dure une nuit. Les ARN sont fixés pendant 2 heures à 80°C.

La préparation des sondes et l'hybridation sont décrites au §8.1. Les membranes sont ensuite exposées une à deux semaines (HyperfilmTM, Amersham).

8.3. RT-PCR non sélective.

La RT-PCR NS est réalisée suivant le protocole décrit par Breton (1993). Les ARNm sont transcrits de façon inverse en ADNc en utilisant une amorce oligodT15. Les

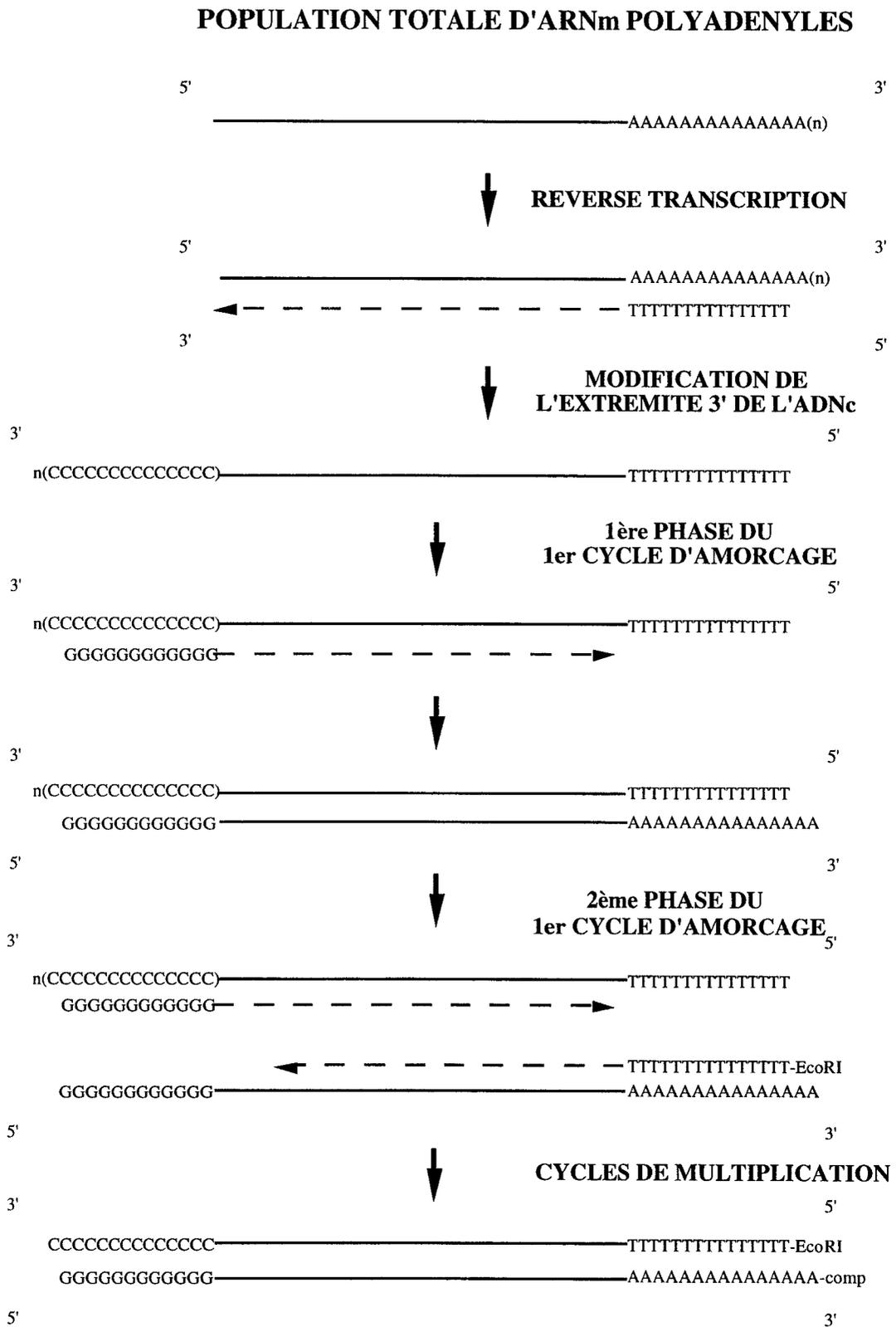


Figure 6 : Principe de la PCR-NS.

ADNc simple brin sont ensuite modifiés en leur extrémité 3' par ajout de dCTP en chaîne par une transférase terminale (Promega). Les amplifications par PCR utilisent une amorce polyT-EcoRI et une amorce polyG, permettant d'amplifier l'ensemble de la population d'ADNc. L'amorce polyT est prolongée en 5' par la séquence correspondant à un site de coupure EcoRI, de façon à augmenter la température d'hybridation de cette amorce, pour qu'elle soit compatible avec celle de l'amorce polyG qui est très élevée. Deux cycles d'amorçage sont néanmoins nécessaires pour permettre la fixation initiale de cette amorce polyT-EcoRI. Le principe et les conditions d'amplification sont donnés dans les figures 6 et 7.

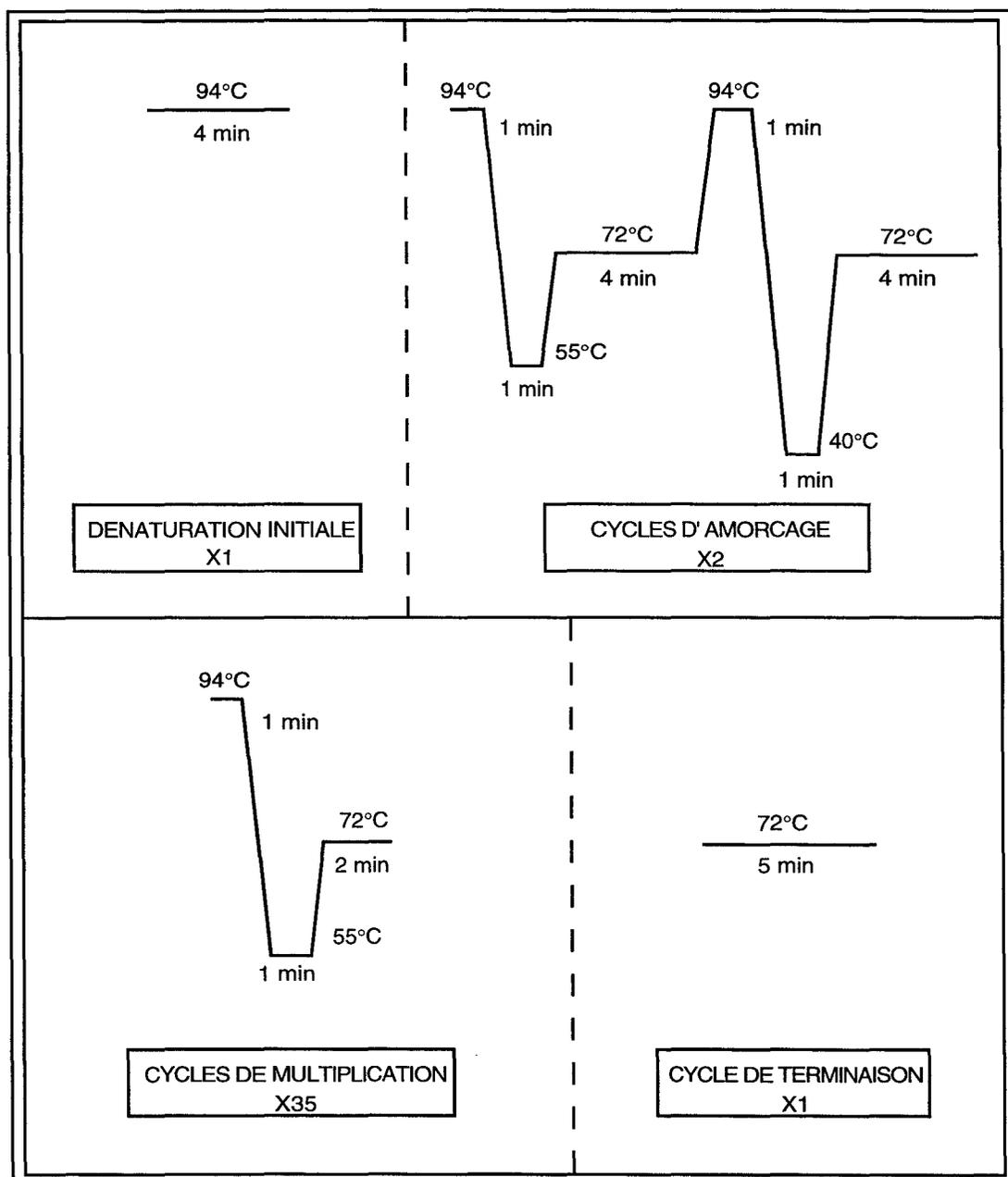


Figure 7 : Cycles thermiques utilisés pour la PCR-NS des ADNc.

9. DETERMINATION DE LA SEQUENCE DE L'EXTREMITE 5' DES PRODUITS CLONÉS.

9.1. Par criblage d'une banque d'ADNc.

Les produits de DDRT-PCR séquencés sont utilisés comme sondes pour cribler une banque d'ADNc de façon à obtenir des ADNc entiers, car ceux obtenus par DDRT-PCR correspondent à l'extrémité 3' des ARNm.

La banque d'ADNc a été réalisée au laboratoire par T. Hendriks, à partir d'ARNm extraits au 3^{ème} jour d'induction de la cinétique d'embryogenèse somatique, en utilisant le kit λ ZAP-cDNA® Synthesis Kit (Stratagene).

Les phages sont transférés par contact pendant 2 min. sur des membranes de nylon (Hybond N, Amersham). Une réplique est réalisée pour chaque membrane (contact de 4 min.). Les membranes sont incubées dans un tampon de dénaturation pendant 2 min. (NaCl 1,5M; NaOH 0,5M) puis neutralisées pendant 5 min. (NaCl 1,5M; Tris-HCl 0,5M pH8). Après 2 passages successifs dans une solution de Tris-HCl 0,2M pH 7,5 et une solution de SSC 2X, les membranes sont séchées à l'air puis fixées pendant 2 heures à 80°C.

Le marquage des sondes, l'hybridation et sa visualisation sont réalisés suivant les modalités précédemment décrites (§ 8.1). Après exposition, les phages positifs sont isolés et un criblage secondaire est réalisé dans les mêmes conditions. Les phagemides pBluescript sont excisés *in vivo* des phages à l'aide du phage Helper ExAssist et vont réinfecter la souche SORL, qui est résistante aux phagemides et permet donc leur amplification.

Des colonies isolées sont piquées à l'aide d'un cure-dent et transférées dans 50 μ l de TTE (Triton 1%, Tris-HCl 20 mM pH8,5, EDTA 2 mM). Les bactéries sont lysées 10 min. à 95°C. Après centrifugation à 10000 g pendant 5 min., le surnageant est utilisé pour des amplifications par PCR, en utilisant les amorces correspondant aux séquences M13 du plasmide.

Les ADNc sont séquencés et les séquences obtenues sont comparées suivant la méthode précédemment décrite (§ 7.3.).

9.2. Par RACE-PCR (Rapid Amplification of cDNA Ends).

Cette technique, initialement décrite par Frohman et al. (1988), permet l'amplification préférentielle des extrémités 5' ou 3' d'un ADNc codant pour un gène donné, au sein d'une population d'ADNc. Elle est basée sur l'utilisation d'une amorce spécifique du gène, et d'une amorce commune à tous les ADNc. Seuls les ADNc encadrés par ces deux amorces seront amplifiés de manière exponentielle au cours des cycles de PCR. Dans notre cas, les ARNm polyadénylés sont soumis à une transcription inverse utilisant comme amorce un oligo dT15. Les ADNc simple brin obtenus sont modifiés en leur extrémité 3' par ajout d'une queue polyC, comme dans le cas d'une PCR-NS. L'amplification par PCR utilisera une amorce polyG en 5' et une amorce correspondant à une région conservée du gène considéré en 3'. Le principe et les conditions d'amplification sont donnés dans les figures 8 et 9.

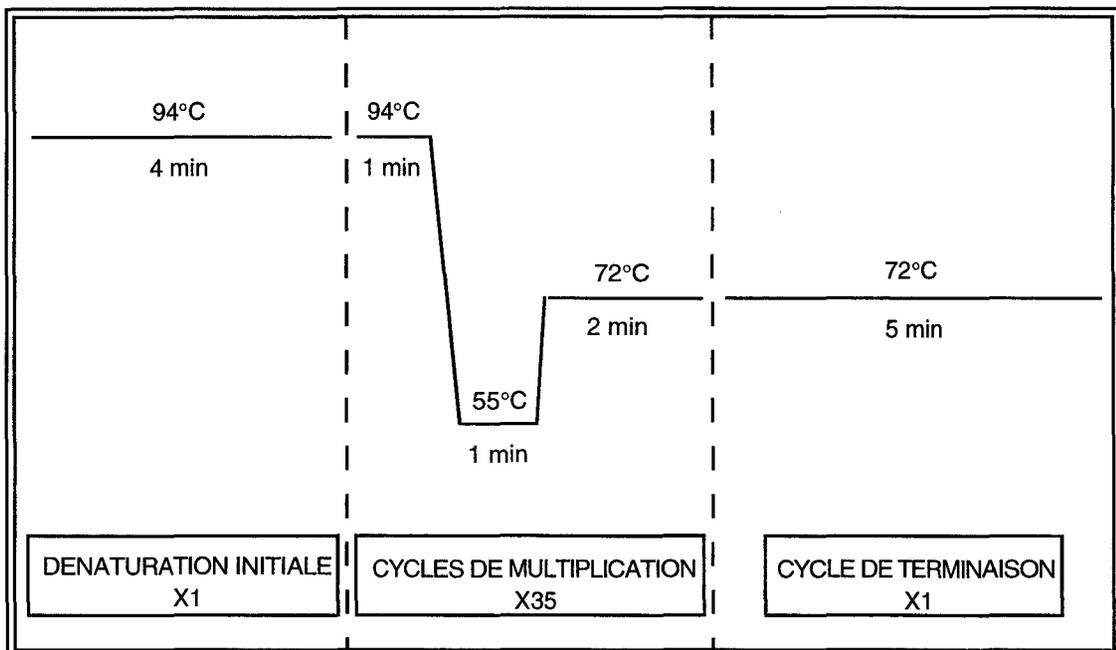


Figure 8 : Cycles thermiques utilisés pour la RACE-PCR.

Le protocole expérimental initial décrit par Bertoli et Burrows (1995) a été modifié. Les différentes étapes de purification sont réalisées sur colonne (QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN)). Les PCR utilisent 3 µl d'ADNc polyC purifiés dilués au 1/10ème, dans un volume réactionnel final de 15 µl. Après une dénaturation initiale de 3 min. à 94°C, les ADNc sont amplifiés par 35 cycles de PCR, comportant une étape de dénaturation de 30 s à 94°C, une étape d'hybridation des amorces de 1 min., et une étape de synthèse de 2 min. à 72°C (figure 9). Après une élongation finale de 10 min. à 72°C, les produits de RACE-PCR obtenus sont séparés sur gel d'agarose, transférés sur une

membrane et hybridés avec la sonde correspondante pour vérifier l'homologie de séquence des produits obtenus. Ces produits sont clonés et séquencés (§ 7.2 et 7.3.).

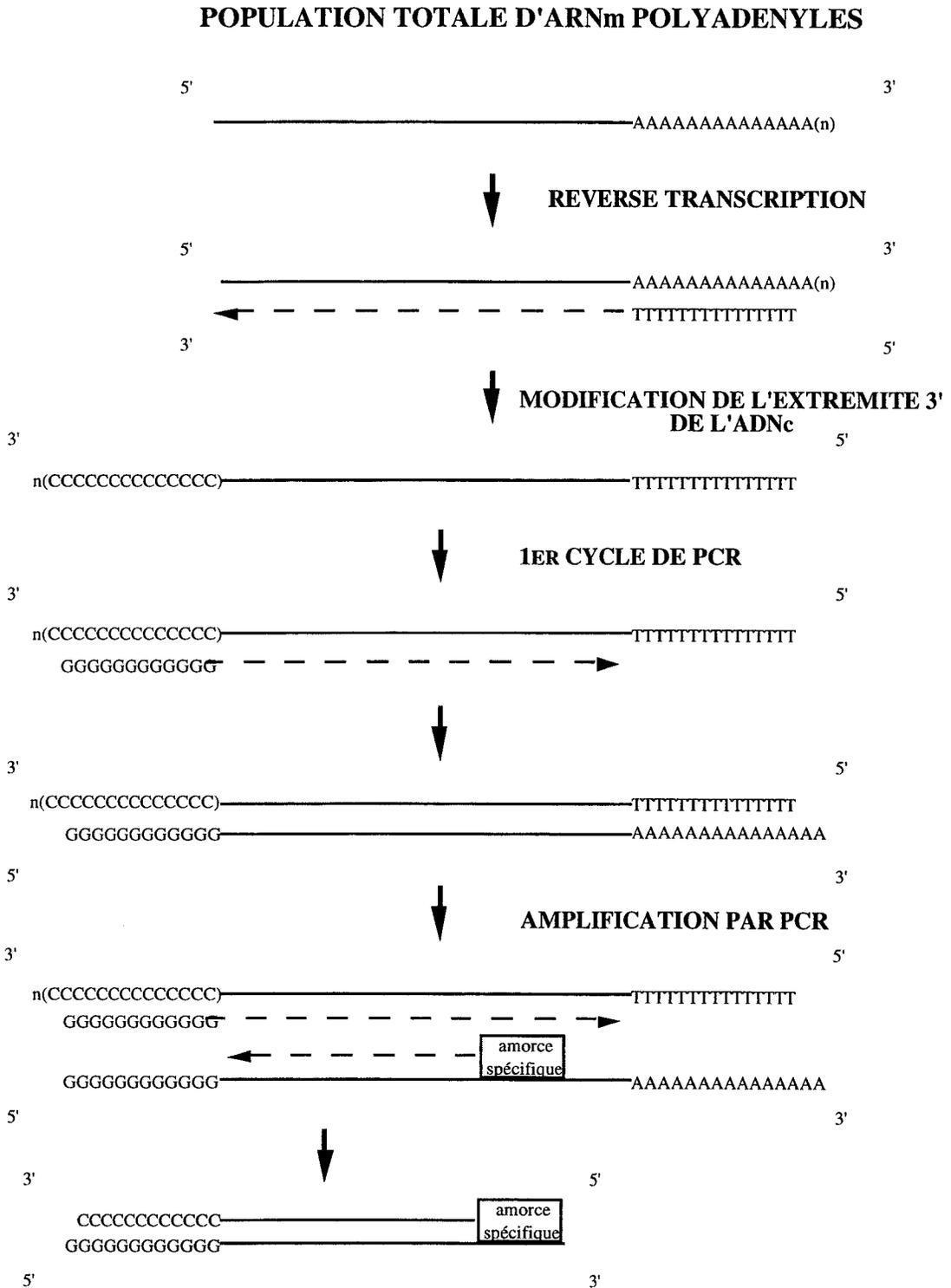


Figure 9 : Principe de la RACE-PCR en 5'.

10. REPRESENTATION GENOMIQUE.

L'ADN génomique est extrait suivant la méthode de Dellaporta et al. (1983). Il est ensuite amplifié par PCR, à raison de 10 ng par réaction. Les amorces sont choisies à partir des résultats de RACE-PCR. Quarante cycles sont réalisés. Ne connaissant pas la taille des gènes, le temps d'élongation choisi est de 4 minutes.

TROISIEME PARTIE

RESULTATS

RESULTATS

1. COUPES CYTOLOGIQUES.

Une étude cytologique détaillée de la 1^{ère} division embryogène chez l'hybride "474" de chicorée a été réalisée par Robatche-Claive dans le cadre de son doctorat (1996). Toutefois, nos conditions de culture étant différentes (saccharose 60mM au lieu de 30mM, 9 fragments / Erlenmeyer au lieu de 3), nous avons réalisé des coupes cytologiques pour caractériser les jours clefs de l'induction de l'embryogenèse somatique chez cet hybride. Cette étude a été réalisée en parallèle chez la chicorée Pévèle, non embryogène dans nos conditions de culture, pour détecter de potentielles modifications cellulaires au cours de la cinétique.

Les différentes figures cellulaires observées dans les fragments foliaires au cours de la mise en place de l'embryogenèse somatique chez la chicorée hybride "474" sont représentées dans la planche photographique 1. La plupart des cellules du mésophylle présentent un cytoplasme pariétal renfermant des chloroplastes, et une vacuole unique très développée. Le noyau, de forme lenticulaire, est aplati contre le plasmalemme, ce qui le rend difficilement visible (pl.1A). Au cours de la cinétique, environ 4% de ces cellules s'engagent dans la voie embryogène. Leur noyau s'arrondit et le nucléole grossit. Elles sont alors en cours de réactivation (pl.1B). Puis le noyau, comportant un ou plusieurs nucléoles volumineux, commence à migrer vers le centre de la cellule. Il est entouré d'un cytoplasme qui s'est densifié, et forme des trabécules qui fragmentent la vacuole. Cet état désigne une cellule réactivée (pl.1C). Au stade ultime de la réactivation, le noyau acquiert une position centrale dans la cellule, où il semble maintenu par le cytoplasme qui l'entoure. Le noyau est alors dans une phase "pré-mitotique". La vacuole s'est divisée en plusieurs unités. Cet état cellulaire correspond au stade de cellule embryogène (pl.1D). Les 1^{ères} divisions de la cellule embryogène aboutissent à la formation d'un pro-embryon (pl.1E), qui évolue ensuite en embryon composé d'une multitude de petites cellules (pl.1F).

Chez la chicorée "474", après 3 jours d'induction, des cellules en cours de réactivation et de rares cellules réactivées, voire embryogènes sont visibles. Aucune division de cellule embryogène n'a pu être visualisée à ce stade. Au 4^{ème} jour, les cellules réactivées et embryogènes sont plus nombreuses. On observe la formation de quelques pro-embryons. Au 5^{ème} jour, tous les états cellulaires précédemment décrits

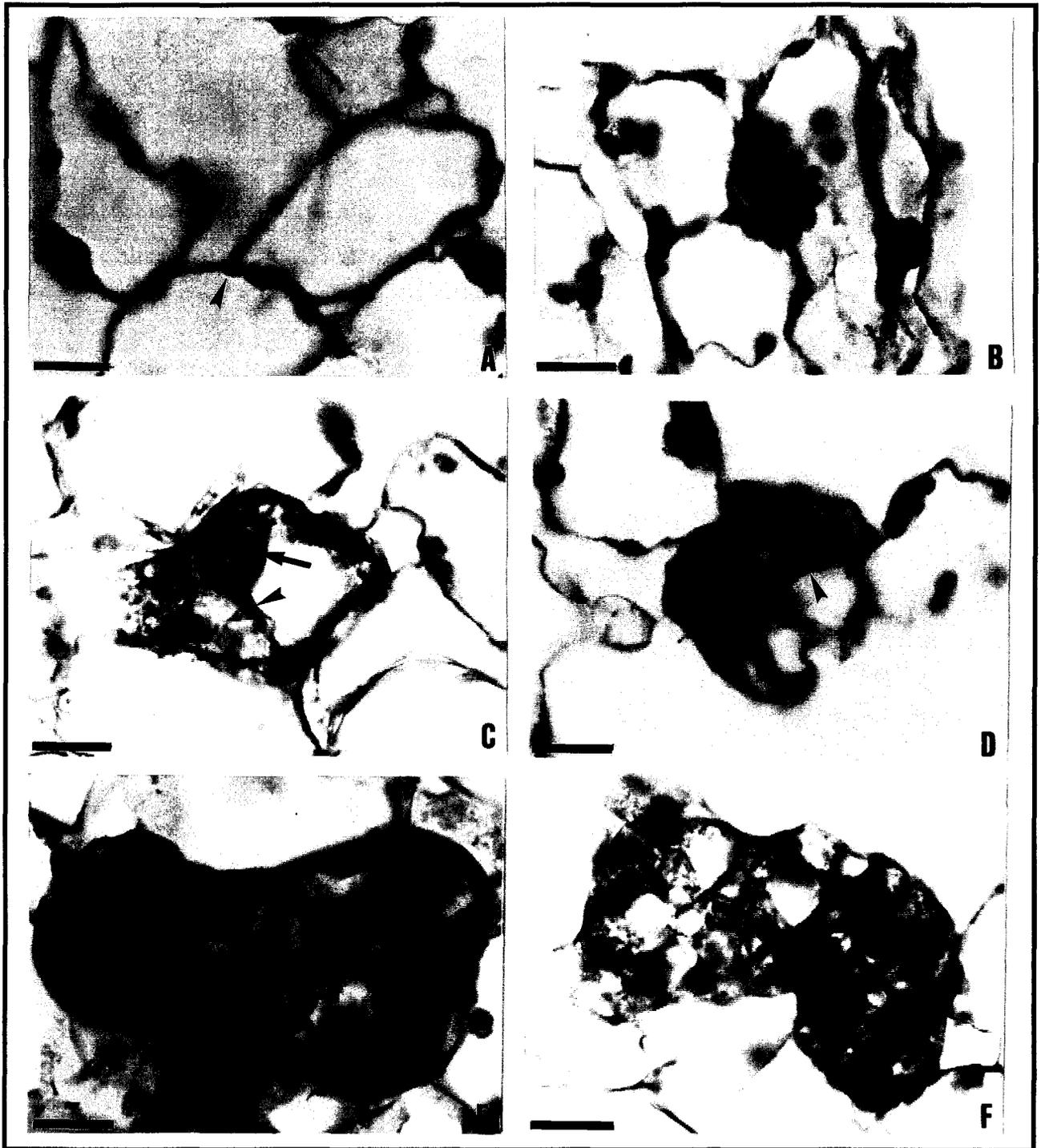


Planche 1 : Figures cellulaires observées dans des fragments foliaires de chicorée hybride "474" cultivés en conditions embryogènes. Inclusion en paraffine et coloration à la safranine/fast green.

A : cellules non réactivées. Les chloroplastes sont répartis dans le cytoplasme pariétal (tête de flèche noire), la paroi est fine.

B : cellule en début de réactivation, le noyau s'arrondit.

C : cellule réactivée. Le noyau comporte un nucléole volumineux actif (flèche) entouré d'une chromatine périnucléolaire claire. Des trabécules cytoplasmiques (tête de flèche) commencent à rayonner à partir du noyau. Le cytoplasme est dense.

D : cellule embryogène. Le noyau occupe une position centrale, les trabécules cytoplasmiques sont densifiées (tête de flèche).

E : pro-embryon. La cellule initiatrice s'est segmentée sans grandissement.

F : pro-embryon pluricellulaire. Il commence son grandissement, ses cellules se divisent activement.

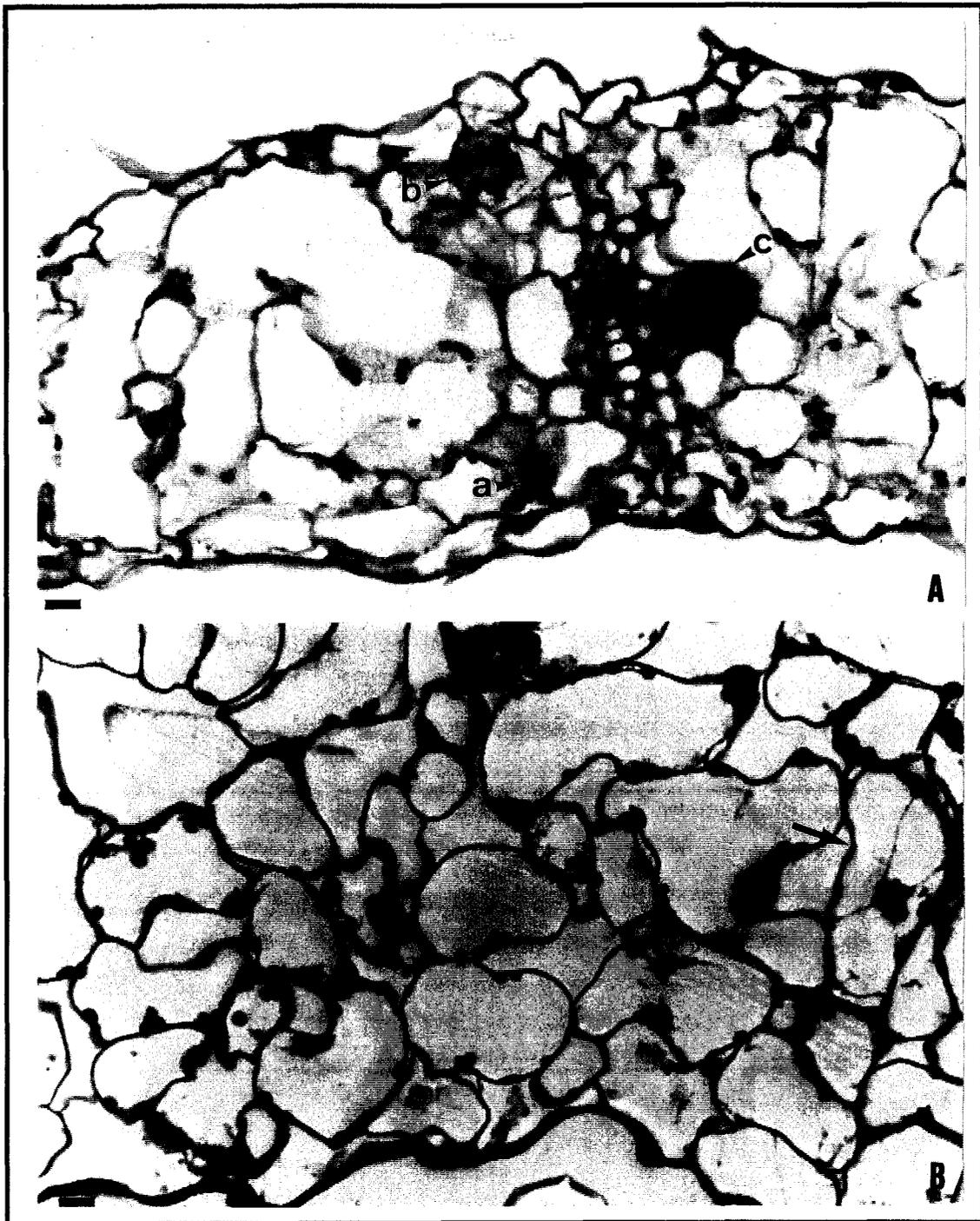


Planche 2 : Comparaison de coupes cytologiques réalisées dans des fragments foliaires après 5 jours d'induction chez l'hybride "474" et la chicorée Pévèle. Barre = 10 μ m.

A : Différents types cellulaires sont observés dans le mésophylle des feuilles de l'hybride "474" embryogène (coupe en paraffine, coloration par la safranine/fast green).

a : Cellule en cours de réactivation.

b : Cellule réactivée.

c : Embryon somatique.

B : Un seul type cellulaire est observé dans le mésophylle de la chicorée Pévèle non embryogène, il s'agit de cellules mésophylliennes typiques. Très rarement, des cellules peuvent présenter un noyau central (flèche). (Coupes en résine JB4 colorées au bleu de toluidine, réalisées suivant les instructions du fournisseur).

sont visualisés (pl.2A). Alors que d'autres cellules sont en cours de réactivation, les cellules réactivées et embryogènes formées dès le 4^{ème} jour évoluent en pro-embryons, et les pro-embryons déjà formés se développent en embryons composés de nombreuses petites cellules.

Chez la chicorée Pévèle, les coupes cytologiques réalisées après 5 jours d'induction n'ont pas permis de déceler la présence de cellules embryogènes caractéristiques. Seules des cellules présentant un noyau arrondi, semblant caractériser un début de réactivation cellulaire sont visibles (pl.2B). Quelques cellules montrent un noyau en position centrale, entouré de cytoplasme trabéculaire. Toutefois, le nucléole reste de petite taille. Il ne présente donc pas de réactivation, contrairement à ce qui est observé chez une cellule qui devient compétente à l'embryogenèse somatique. Aucun embryon n'est visualisé, même à l'issue de la culture (J5+7).

2. SYNTHÈSE PROTÉIQUE ET TRADUCTION *IN VITRO* DES ARN MESSAGERS AU COURS DE LA CINÉTIQUE D'EMBRYOGENÈSE SOMATIQUE.

Les protéines nouvellement synthétisées à chacun des jours de la cinétique et les produits de traduction *in vitro* des ARNm polyadénylés sont séparés par électrophorèse bidimensionnelle; les autoradiographies obtenues sont présentées dans les planches photographiques 3 et 4. Les autoradiographies sont analysées par informatique à partir d'une station de travail Sun Sparcstation, par l'intermédiaire du logiciel 2-D Analyser. Après avoir défini des points communs entre deux autoradiographies correspondant à deux jours consécutifs, les profils sont comparés et une image "composite" est obtenue. Elle correspond à la somme des deux autoradiographies comparées. La figure 10 en présente un exemple; elle correspond à la "composite" des produits de traduction *in vitro* des ARNm extraits aux 1^{er} et 2^{ème} jours de culture (J1 et J2). Les spots communs aux deux jours apparaissent en noir, les spots spécifiques à l'un ou l'autre jour apparaissent en gris clair. Pour nos analyses, nous ne prenons en compte que les modifications qualitatives qui interviennent dans la synthèse des protéines et ARNm au cours de la cinétique d'embryogenèse somatique. Elles sont donc basées sur la présence ou l'absence des protéines et des ARNm, et ne considèrent pas les modifications quantitatives qui existent.

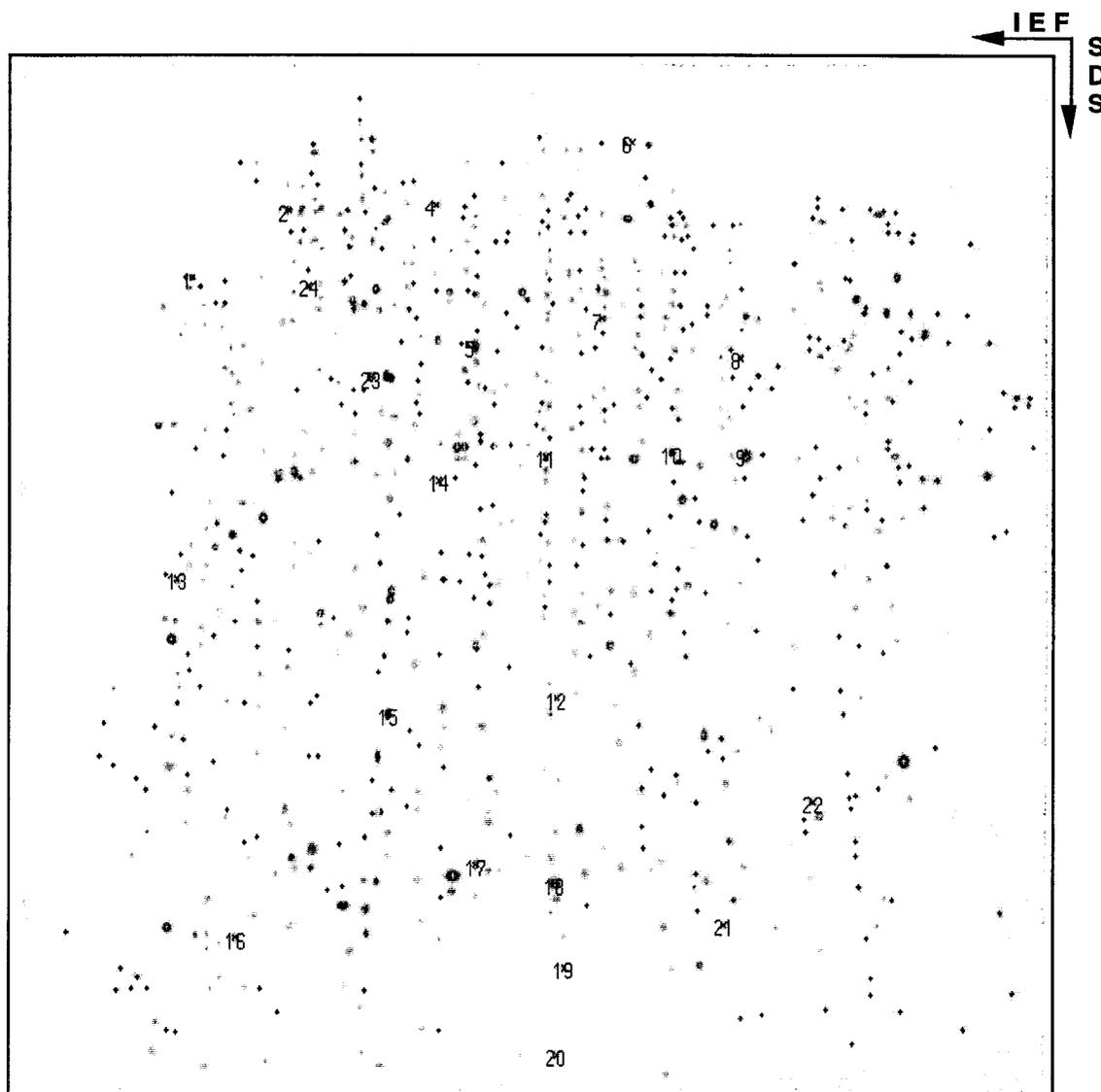


Figure 10 : Image "composite" issue de la comparaison des autoradiographies correspondant aux produits de traduction *in vitro* des ARNm isolés aux J1 et J2 de la cinétique d'embryogenèse somatique. Les points communs choisis comme références sont numérotés. Les autres spots communs apparaissent en noir, les spots spécifiques à J1 ou J2 apparaissent en gris.

2.1. Marquage *in vivo* des protéines.

Pour cette expérience, nous ne disposons pas de témoin J0. Dans l'ensemble de nos travaux, le témoin J0 correspond à des fragments foliaires qui ne sont pas soumis à l'embryogenèse somatique. Or lors d'un marquage *in vivo* des protéines, une mise en culture des fragments foliaires pendant 4 heures est nécessaire, ce qui ne nous permet pas d'avoir un témoin J0 tel que nous l'avons défini. Notre analyse débute donc au J1 de la cinétique. Les autoradiographies obtenues sont présentées dans la planche photographique 3.

Le tableau 1 résume les modifications qualitatives globales intervenant dans la synthèse protéique entre deux jours successifs.

Comparaison x/y	Spots identiques	Spots spécifiques à x	Spots spécifiques à y	Total des spots visualisés	% de spots identiques/ total
J1/J2	497	305	237	1039	48
J2/J4	384	352	196	932	41
J4/J5	425	155	293	873	49

Tableau 1 : Résultats de l'analyse informatique des autoradiographies de protéines marquées *in vivo*.

Entre 2 jours x et y comparés, près de 50% des spots totaux visualisés sont identiques. Les 50% restants sont composés de spots présents au jour x, qui disparaissent au jour y, et de spots apparaissant au jour y alors qu'ils ne sont pas visualisés au jour x.

Une analyse plus détaillée permet de classer ces protéines dans différents groupes, suivant leur cinétique de détection.

Parmi les 1632 protéines détectées sur l'ensemble des gels, 221 sont retrouvées à chacun des jours de la cinétique, les autres protéines visualisées apparaissent ou disparaissent à un moment donné de la cinétique d'embryogenèse.

Parmi les protéines qui disparaissent au cours de la cinétique, 52 sont présentes jusqu'à J4 et ne sont plus détectées à J5 (groupe a), 197 sont présentes jusqu'à J2/J3 et ne sont plus détectées à J4 (groupe b), 305 sont présentes à J1 et ont disparu dès J2 (groupe c).

Parmi les protéines qui apparaissent au cours de la cinétique, 63 apparaissent à J2 et sont encore présentes à J5 (groupe d), 134 apparaissent à J3/J4 et sont encore présentes à J5 (groupe e), 293 apparaissent à J5 (groupe f), et 22 protéines apparaissent à J2, sont présentes à J3/J4, mais disparaissent à J5 (groupe g).

D'autres protéines sont spécifiques à l'un des jours de la cinétique; ainsi 241 protéines sont spécifiquement détectées à J2 (groupe h), et 104 protéines sont spécifiques au J4 (groupe i).

- Résultats -

Conclusion : la synthèse de nombreuses protéines est affectée au cours de la culture. En résumé, 554 disparaissent (réparties dans les groupes a, b et c), 490 apparaissent et sont encore présentes à la fin de la culture (groupes d, e et f), 367 sont synthétisées de façon transitoire (groupes g, h et i).

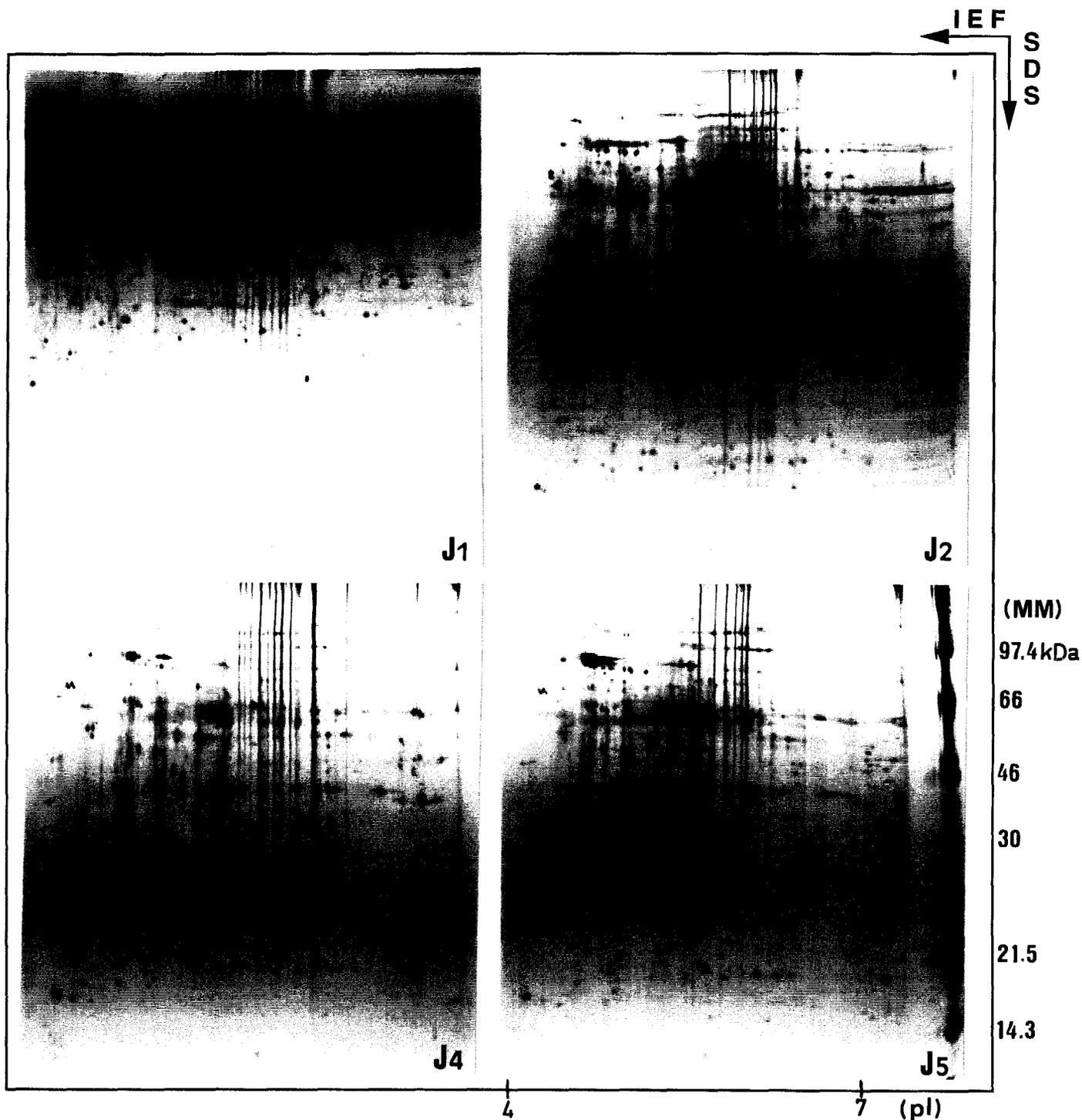


Planche 3 : autoradiographies des protéines marquées *in vivo* séparées par électrophorèse bidimensionnelle. J1 à J5 : feuilles induites 1 à 5 jours.

2.2. Traduction *in vitro* des ARNm.

Plus de 500 spots sont visualisés à chacun des jours de la cinétique d'embryogenèse (planche photographique 4). Les modifications détectées dans les profils des ARNm traductibles d'un jour à l'autre de l'embryogenèse sont résumées dans le tableau 2. Il présente les variations qualitatives globales visualisées entre 2 jours consécutifs de la cinétique d'embryogenèse.

Comparaison x/y	Spots identiques	Spots spécifiques à x	Spots spécifiques à y	Total des spots visualisés	% de spots identiques /total
J0/J1	207	312	414	933	22
J1/J2	410	215	196	821	50
J2/J3	320	285	238	843	38
J3/J4	439	118	252	809	54
J4/J5	376	312	290	978	38

Tableau 2 : Résultats de l'analyse informatique des autoradiographies de produits de traduction *in vitro*.

Les stades J0 et J1 sont très différents, ils présentent le pourcentage d'identité le plus faible de la cinétique (22%). Durant la cinétique d'embryogenèse, la proportion de modifications qualitatives la plus importante intervient entre les J2/J3, et J4/J5.

Une analyse plus détaillée nous permet de classer les produits de traduction obtenus dans différents groupes.

Sur les 1775 produits de traduction visualisés sur l'ensemble des autoradiographies, seuls 74 sont retrouvés à chacun des jours de la cinétique.

Certains produits correspondent à des transcrits qui disparaissent au cours de la cinétique, 16 sont présents de J0 à J4 et disparus à J5 (groupe a), 9 sont présents de J0 à J3 et disparus à J4 (groupe b), 40 sont présents de J0 à J2 et disparus à J3 (groupe c), 50 sont présents de J0 à J1 et disparus à J2 (groupe d) et 312 sont présents uniquement à J0 (groupe e).

IEF
↓
SDS

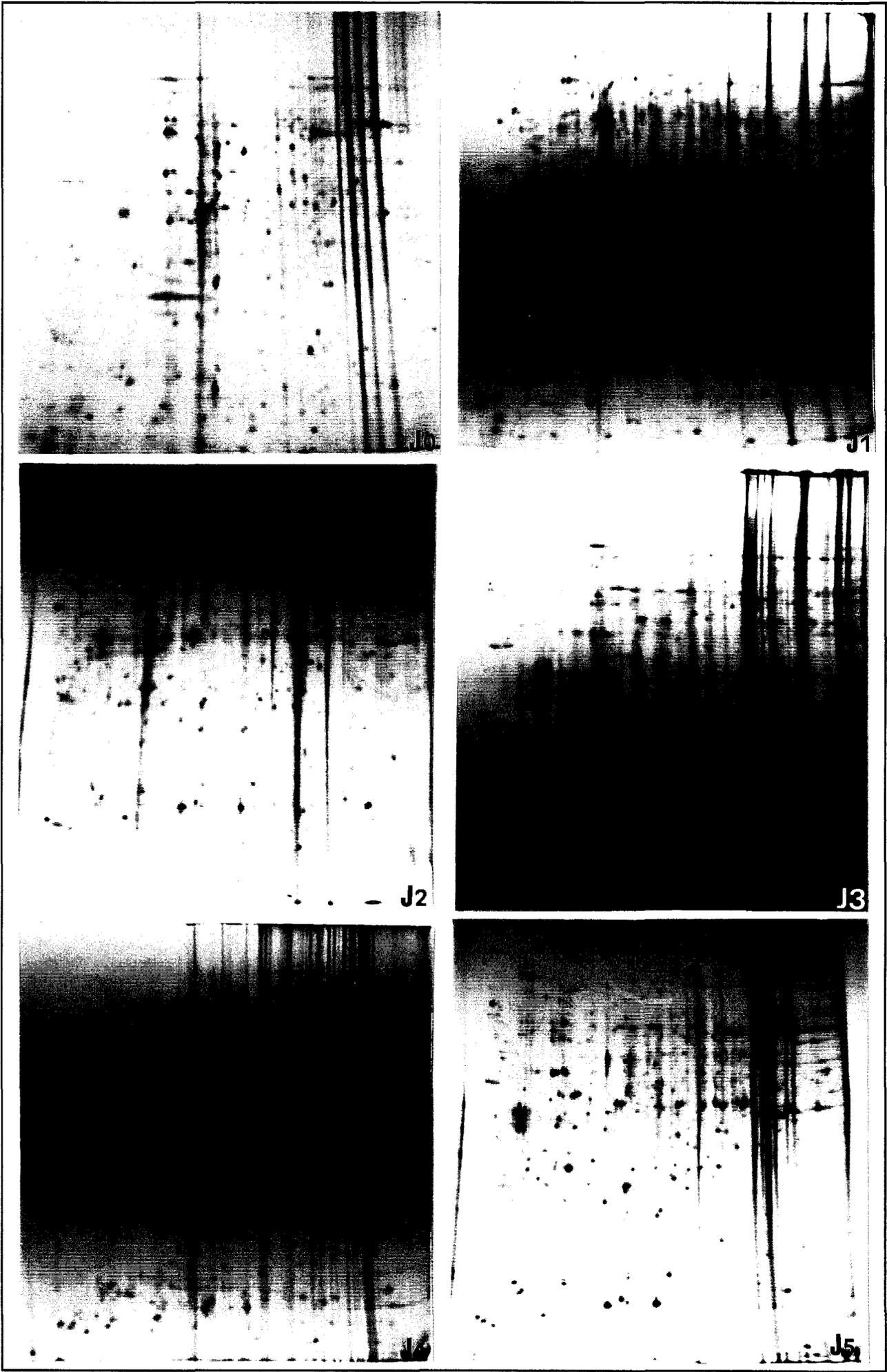


Planche 4 : autoradiographies des produits de traduction *in vitro* séparés par électrophorèse bidimensionnelle, obtenus à partir d'ARNm extraits aux différents jours de la cinétique : J0 : feuilles non induites, J1 à J5 : feuilles induites de 1 à 5 jours.

Parmi les produits de traduction qui apparaissent au cours de la cinétique, certains correspondent à des ARNm qui sont synthétisés jusqu'au J5. Ainsi, 75 apparaissent au J1 (groupe f), 33 au J2 (groupe g), 75 au J3 (groupe h), 116 au J4 (groupe i) et 290 sont détectés au J5 (groupe j).

D'autres produits apparaissent de façon transitoire. On dénombre ainsi 32 produits correspondant à des ARNm synthétisés de J1 à J4 (groupe k), 29 à des ARNm synthétisés de J1 à J3 (groupe l), 113 à des ARNm synthétisés de J1 à J2 (groupe m), 19 ARNm synthétisés de J2 à J4 (groupe n), 12 à des ARNm synthétisés de J2 à J3 (groupe o) et 95 à des ARNm synthétisés de J3 à J4 (groupe p).

Enfin, certains produits sont spécifiquement visualisés à l'un des jours de la cinétique. Ainsi, 165 spots sont spécifiques à J1 (groupe q), 132 à J2 (groupe r), 68 à J3 (groupe s) et 136 à J4 (groupe t).

Conclusion : l'accumulation des transcrits est très affectée au cours de la culture en condition d'embryogenèse. En résumé, 427 produits de traduction, correspondant à des ARNm présents dans les feuilles à J0, disparaissent au cours de la cinétique d'embryogenèse (répartis dans les groupes a, b, c, d et e), 473 produits représentant des ARNm non visualisés à J0 apparaissent et sont présents jusqu'à la fin de la culture (groupes f, g, h, i et j), et 801 ARNm sont représentés de façon transitoire (groupes k, l, m, n, o, p, q, r, s et t).

Conclusion générale : des modifications interviennent dans l'expression des gènes tout au long de la culture. De nombreux ARNm et protéines disparaissent alors que d'autres apparaissent ou sont synthétisés de façon transitoire. Très peu d'ARNm sont synthétisés de façon constitutive. La mise en culture entraîne une altération remarquable des profils de traduction *in vitro*, et donc des ARNm traductibles.

3 ISOLEMENT DE GENES EXPRIMES AU COURS DES ETAPES PRECOCES DE L'EMBRYOGENESE SOMATIQUE.

3.1. Isolement par DDRT-PCR d'ADNc partiels correspondant à des ARNm exprimés différemment au cours de l'embryogenèse somatique.

3.1.1. Profils d'ADNc obtenus.

La transcription inverse différentielle est réalisée avec l'amorce T12GC, choisie arbitrairement. Les ADNc simple brin obtenus sont ensuite amplifiés par PCR, en utilisant une amorce aléatoire de 10 nucléotides et l'amorce T12GC. Vingt amorces aléatoires ont été ainsi testées, produisant des profils plus ou moins complexes.

Sur les 20 profils obtenus, seul le profil de l'amorce B3 ne présente pas d'ADNc amplifiés. Ceci suppose qu'aucune séquence complémentaire à celle de l'amorce B3 n'existe sur les ADNc complets simple brin obtenus après la transcription inverse différentielle. En conséquence, au cours de l'embryogenèse, aucune séquence transcrite (ayant les 2 bases discriminantes G et C en 3') n'est composée des 10 nucléotides que comporte l'amorce B3. Cette amorce ne permet pas non plus d'obtenir une amplification lors d'expériences de RAPD sur l'ADN génomique de l'hybride "474" (Bria, communication personnelle). A l'inverse, pour le couple d'amorces T12GC/B2, on peut dénombrer 30 bandes dont les tailles sont comprises entre 200 et 1500 pb (figure 11).

Sur les profils, les ADNc partiels visualisés correspondent à des ARNm qui peuvent être classés dans 3 groupes:

- Les ARNm transcrits de la même manière dans les feuilles des vitroplants et tout au long de la cinétique de l'embryogenèse somatique; ils correspondent à des gènes exprimés constitutivement et sont appelés gènes domestiques (figure 11, A).

- Les ARNm qui disparaissent ou sont moins transcrits au cours de la cinétique alors qu'ils sont transcrits dans les feuilles des vitroplants (figure 11, B).

- Les ARNm qui apparaissent ou qui sont transcrits plus abondamment au cours de l'embryogenèse (figure 11, C).

Toute modification dans l'accumulation d'un transcrit au cours de la culture peut, dans l'absolu, être liée à la mise en place ou au déroulement de l'embryogenèse somatique. Suivant les profils, entre 10 et 30 % des produits visualisés sont concernés. Bien qu'ils soient tous potentiellement intéressants, nous avons sélectionné deux ADNc représentant des ARNm plus abondamment transcrits au cours de la cinétique embryogène, et réalisé une étude précise de leur implication dans l'embryogenèse somatique.

- Résultats -

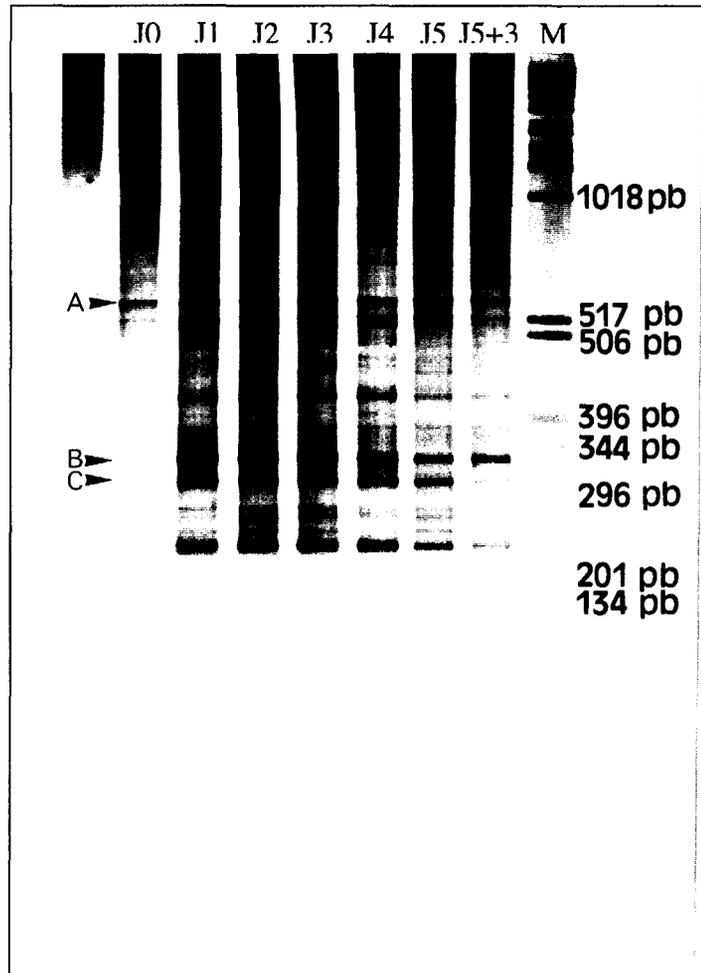


Figure 11 : Electrophorégramme en gel d'acrylamide non dénaturant des produits de DDRT-PCR obtenus avec le couple d'amorces T12GC/B2, coloré à l'argent.

A : Produit visualisé de façon constante.

B : Produit dont la synthèse est importante au J1, puis diminue au cours de la cinétique.

C : Produit apparaissant lors de la culture embryogène.

Les ARNm sont extraits de : J0 : Feuilles non induites.

J1 à J5 : Feuilles prélevées après 1 à 5 jours d'induction.

J5+3 : Feuilles prélevées 3 jours après transfert sur milieu d'expression.

3.1.2 . Choix et isolement d' ADNc partiels correspondant à des ARNm transcrits différemment.

Les deux ADNc partiels choisis correspondent à des ARNm qui s'accumulent de façon différente dans les tissus foliaires au cours de l'embryogenèse somatique.

Le premier est obtenu avec l'amorce B1 et est constitué d'environ 540 pb; il est nommé B1.5 (B1 pour l'amorce B1 utilisée, 5 pour le jour de la cinétique à partir duquel

il est amplifié) (figure 12, A). Il est absent des feuilles non induites, très peu représenté jusqu'au J4, mais sa synthèse est amplifiée à partir du jour 5 de la cinétique, le 5^{ème} jour de la phase d'induction étant caractérisé par les 1^{ères} divisions embryonnaires.

Le second est obtenu avec l'amorce B5 et est composé d'environ 570 pb; il est nommé B5.3 suivant les mêmes modalités que celles précédemment décrites (figure 12, B). Détecté au J0, sa synthèse s'accroît jusqu'au J3 de la cinétique, moment où apparaissent les 1^{ères} cellules réactivées, et reste importante jusqu'au J5+3.

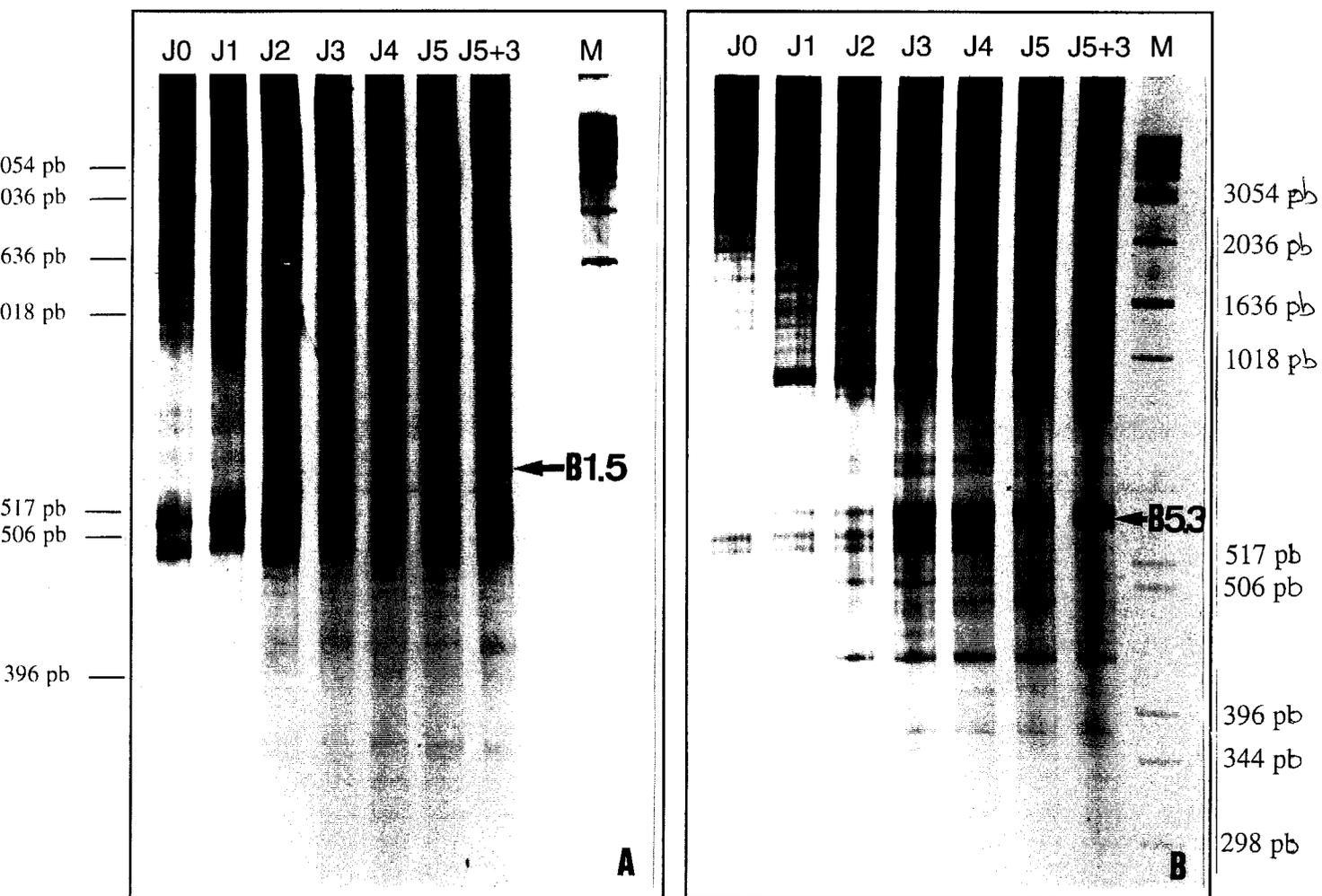


Figure 12 : Electrophorogrammes en gel d'acrylamide non dénaturant des produits de DDRT-PCR obtenus avec les couples d'amorces T12GC/B1 (A) et T12GC/B5 (B), colorés à l'argent. Les produits sélectionnés pour une étude complémentaire sont indiqués par des flèches (→). Ils sont nommés respectivement B1.5 et B5.3.

Après élution du gel, et réamplification par PCR en utilisant les mêmes amorces que celles utilisées pour leur mise en évidence, les fragments d'ADNc B1.5 et B5.3 sont clonés dans le vecteur pTAg (R&D Systems). L'ADN plasmidique de 8 colonies bactériennes transformées prélevées au hasard est extrait et digéré. Les inserts des

clones positifs réamplifiés en utilisant les amorces M13 du plasmide situés de part et d'autre du site de clonage, de façon à accumuler une quantité importante d'ADNc pour les expériences ultérieures. Pour chacune des amorces, trois clones positifs sont sélectionnés pour un séquençage.

3.1.3. Séquençage des clones d'ADNc partiels isolés.

La séquence nucléotidique de chaque clone a été déterminée par séquençage suivant la méthode de Sanger, à l'aide des amorces M13 du plasmide PTag. La séquence obtenue pour les 3 clones provenant des produits de B1.5 est présentée dans la figure 13.

	F	A	P	M	Y	Y	R	G	A	A	A	A	I	I	V	Y	
GT	TTC	GCT	CCT	ATG	TAC	TAC	AGG	GGC	GCT	GCA	GCA	GCA	ATT	ATT	GTC	TAC	
			11			20			29			38			47		
D	I	T	S	A	D	S	F	T	R	A	K	K	W	V	Q	E	L
GAT	ATC	ACT	AGC	GCG	GAT	TCA	TTT	ACA	CGG	GCT	AAA	AAG	TGG	GTT	CAA	GAA	CTT
		59			68			77			86			95			104
Q	K	Q	G	N	P	N	M	V	M	A	L	A	G	N	K	A	D
CAA	AAA	CAA	GGT	AAT	CCA	AAC	ATG	GTA	ATG	GCA	CTT	GCT	GGA	AAT	AAA	GCT	GAT
		113			122			131			140			149			158
L	E	D	K	R	K	V	T	A	E	E	A	R	V	Y	A	E	E
CTT	GAA	GAC	AAA	AGG	AAA	GTA	ACA	GCA	GAA	GAA	GCA	CGT	GTA	TAT	GCT	GAA	GAG
		167			176			185			194			203			212
N	G	L	F	F	M	E	T	S	A	K	T	A	A	D	V	N	D
AAT	GGT	CTC	TTT	TTC	ATG	GAG	ACA	TCA	GCT	AAA	ACT	GCT	GCT	GAT	GTT	AAC	GAC
		221			230			239			248			257			266
V	F	H	E	I	A	K	R	L	P	R	A	Q	P	T	Q	N	P
GTA	TTT	CAT	GAA	ATC	GCC	AAG	AGA	CTA	CCT	AGA	GCT	CAG	CCT	ACT	CAG	AAT	CCA
		275			284			293			302			311			320
A	G	M	V	L	V	D	R	P	A	E	G	A	R	A	A	S	C
GCT	GGC	ATG	GTT	CTT	GTT	GAC	AGA	CCA	GCT	GAA	GGG	GCC	CGT	GCT	GCA	TCA	TGC
		329			338			347			356			365			374
C	S	.															
TGT	TCA	TAA	GTA	ATG	TTT	TTA	ATT	CTT	GAT	TGA	TGA	TGT	TTT	TAG	TTT	GTT	TTT
		383			392			401			410			419			428
ATG	TGT	ATT	TGT	CAT	TGG	AAG	ATT	ACG	GGA	ATA	TCA	TGA	AAA	TTT	GAT	GTC	AAT
		437			446			455			464			473			482
AAA	AAA	TGT	TAA	AGG	TGC	A											
		491			500												

Figure 13 : Séquence de B1.5.

La séquence codante est notée en caractères gras. Les acides aminés correspondants apparaissent au-dessus de chaque codon.

La séquence B1.5 comporte 501 pb et est bordée en 5' de la séquence de l'amorce aléatoire B1 et en 3' d'une partie restreinte de la séquence complémentaire à l'amorce T12GC. Les 3 possibilités de cadre de lecture des codons nucléiques ont été envisagées; la traduction en acides aminés montre que le cadre de lecture le plus probable est celui

- Résultats -

qui correspond à une protéine présentant de fortes homologies avec des protéines de liaison au GTP de végétaux (tableau 3).

Espèce	Identité nucléique	Identité protéique
<i>Vicia faba</i>	83% / 385 pb	92%
<i>Lotus japonicus</i>	78% / 446 pb	93%
<i>Nicotiana plumbaginifolia</i>	80% / 383 pb	88%
<i>Nicotiana tabacum</i>	77% / 390 pb	87%

Tableau 3 : Pourcentages d'homologies nucléiques et protéiques obtenus après comparaison de la séquence B1.5 avec celles des banques de données.

Un exemple d'alignement obtenu est donné dans la figure 14.

```

>>EM_PL:VFRABGTPB Z37503 V.faba mRNA for guanine nucleot (873 nt)
83.377% identity in 385 nt overlap

      10      20      30
B1.5      GTTTCGCTCCCTATGTACTACAGGGGCGCTG
      : : : : : : : : : : : : : : : : : :
EM_PL: GGGACACAGCGGGGCAAGAGAGATACCATAGCCTGGCTCCCATGTATTACAGAGGCGCTG
      300      310      320      330      340      350

      40      50      60      70      80      90
B1.5      CAGCAGCAATTATTGTCTACGATATCACTAGCGCGGATTCATTTACACGGGCTAAAAAGT
      : : : : : : : : : : : : : : : : : :
EM_PL: CTGCTGCTATCATTTGTCTATGACATCACTAGCTCAGATTCATTTACACGAGCTAAAAAGT
      360      370      380      390      400      410

      100     110     120     130     140     150
B1.5      GGGTTCAAGAACTTCAAAAACAAGGTAATCCAAACATGGTAATGGCACTTGCTGGAAAATA
      : : : : : : : : : : : : : : : : : :
EM_PL: GGGTTCAAGAGCTTCAAAAGCAAGGTAATCCGAACATGGTCATGGCTCTCACTGGTAACA
      420     430     440     450     460     470

      160     170     180     190     200     210
B1.5      AAGCTGATCTTGAAGACAAAAGGAAAGTAACAGCAGAAGAAGCACGTGTATATGCTGAAG
      : : : : : : : : : : : : : : : : : :
EM_PL: AATCTGACTTGGAAAGACAAAAGAAAGTGACAGCCGAAGAAGCACGTGTATATGCAGAAG
      480     490     500     510     520     530

      220     230     240     250     260     270
B1.5      AGAATGGTCTCTTTTTCATGGAGACATCAGCTAAAACCTGCTGCTGATGTTAACGACGTAT
      : : : : : : : : : : : : : : : : : :
EM_PL: AAAATGGTCTGTTTTTCATGGAGACCTCTGCCAAATCTGCAGCCAATGTTAATGATGTAT
      540     550     560     570     580     590

      280     290     300     310     320     330
B1.5      TTCATGAAATCGCCAAGAGACTACCTAGAGCTCAGCCTACTCAGAATCCAGCTGGCATGG
      : : : : : : : : : : : : : : : : : :
EM_PL: TTTATGAAATFGCCAAGAGATTACCAAGGCTCAGCCAGCTCAAAAATCCGGCAGGGATGG
      600     610     620     630     640     650

      340     350     360     370     380     390
B1.5      TTCTTGTGTTGACAGACCAGCTGAAGGGGCCCGTGCATCATGCTGTTTCATAAGTAATGT
      : : : : : : : : : : : : : : : : : :
EM_PL: TTCTTGTGTTGATAGACCACCGAAGGATCTAGGGCTGCATCCTGTTGTTTCATAAGTGTTC
      660     670     680     690     700     710

      400     410     420     430     440     450
B1.5      TTTTAATCTTGATGATGATGTTTTAGTTTGTTTTTATGTGTATTGTGCATTTGGAAGA
EM_PL: TGCTGTACTTACCCGCCCTCACTTTAATTCCTATTGTTTTTCAGTGGTTCGTATGTACTGCA
      720     730     740     750     760     770
    
```

Figure 14 : Alignement de la séquence nucléotidique B1.5 avec celle d'une petite protéine de liaison au GTP de *Vicia faba*.

- Résultats -

La séquence obtenue avec les 3 clones correspondant à B5.3 (figure 15) ne donne que de faibles pourcentages d'homologies avec les séquences répertoriées dans la banque EPLN. Toutefois, dans la banque ESTs, une homologie de 69% est obtenue avec un EST de riz, et de 66% avec un EST d'Arabidopsis (figure 16).

```

TGCGCCCTTCATCTAAGCGGACAATTTATATATGTGGACGGCCTCGTTGG 50
ACATTTGTTCTGGCATTTCCTGCAGTGAGTTTTCTTCCTTTGGTTTGT 100
CTTGCGGCCTCTTGACTTTGTTAGGGCATTGAGCACCGACCTTCTTGCTA 150
CTATCGTGCATGCAAGCTTTCGAACACCTAATCTGAAAGCCCGTCTCAAT 200
ACATTCCGTGAGGAATTCGTGCGGTTTGGCGCAATTACAGCGAACTGAA 250
TCACCACTATCCATGGACGCAAGTTGATTATGAAGAAAAGAAGGAAGTGG 300
TATTTTGAGGGTGGACTTGCTATTGATGCTGCAGTTGCGGAATAATCCTT 350
CTAGAAGCTGCCTGGAGGTATATTGGATAACATGACATAAAGATATTTGC 400
TTATTAAACCCCAAGTGGGTATAAAAAGGGGAAAAAAGAAGAAGAGGGAA 450
AGATTATGTAAAGTCTGTTGGGATTTTGAATATTCACCTTTTATGCTTT 500
AGTAGCTGGTGGTTCAATTTGTTTCATGAACATGTGGAGTGGATCAAAC 550
TTGAACATTCTTTTGACGGGC 571
    
```

Figure 15 : Séquence nucléotidique du clone B5.3.

>>EM_EST10:C28810 C28810 Rice cDNA, partial sequence (401 nt) 69.456% identity in 239 nt overlap

```

                10      20      30      40
b5.3,          TGCGCCCTTCATCTAAGCGGACAATTTATATATGTGGACGG
                :: :: :: : :: : :: : :: :
EM_EST ATAACCCCTGTTCTTCGTGGTAGACCAAGTTCAAAGAGGTCGATTCATATTTGTGGGCGA
      110      120      130      140      150      160

                50      60      70      80      90      100
b5.3,   CCTCGTTGGACATTTGTTCTGGCATTTCCTGCAGTGAGTTTTCTTCCTTTGGTTTGTTC
                :: :: :: : :: : :: : :: : :: : :: :
EM_EST CCTCGCTGGCTATTTGTGCTGTTATTTCTGCAGTTAG-TTGCATGCTCTGGTTGACTTC
      170      180      190      200      210      220

                110      120      130      140      150      160
b5.3,   TTGCGGCCTCTTGAC-TTTGTTAGGGCATTGAGCACCGACCTTCTTGCTACTATCGTGCA
                :: : :: : :: : :: : :: : : : : :: : :: :
EM_EST CTGCAGTCTCCTCACAGTTCATGGGCCCTTTTAATTGCTATCTTTGCAACTCTGCTTCA
      230      240      250      260      270      280

                170      180      190      200      210      220
b5.3,   TGCAAGCTTTCGAACACCTAATCTGAAAGCCCGTCTCAATACATTCCGTGAGGAATTCG
                :: : :: : :: : :: : :: : :: : :: : :: :
EM_EST TGCTAGCTTCAGANCACTAATCTGANAGCACGTCTGAATACATTAGAGAAGAATTCG
      290      300      310      320      330      340

                230      240      250      260      270
b5.3,   TGCGGTTT--GGCGCAATTACAGCGAACTGAATCACCACTATCCATGGACGCAAGTTGAT
                :: :: :: : : : : : :
EM_EST AGCTGTTTTNGGAGGGAATATAGTGAGCTTTAGGGTTCANGTTGGGAAGAAGGT
      350      360      370      380      390      400
    
```

- Résultats -

>>EM_EST9:AT92612 R89926 16281 Lambda-PRL2 Arabidopsis t (495 nt)
66.803% identity in 244 nt overlap

```

                                     10      20      30
b5.3,                               TGCGCCCTTCATCTAAGCGGACAATTTATAT
                                     ::: :: :::: : : : : : : : :
EM_EST GAGACCNCCTTTGACACCTGTCACCTCGTGGGCGTCCATCATCAAAGAGAGCAATCCATGT
                                     10      20      30      40      50      60

                                     40      50      60      70      80      90
b5.3,  ATGTGGACGGCCTCGTTGGACATTTGTTCTGGCATTTCCTGCAGTGAGTTTCTTCCCTTT
        : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
EM_EST ATGTGGTCAACCCCGTTGGGTTTTGTNTTGACATNCTCACTTGTNAGTTTGGCT-CTTT
        70      80      90      100     110

                                     100     110     120     130     140     150
b5.3,  GGTTTGTTTCTTGCGGCCCTCTTGACTTTGTTAG-GGCATTGAGCACCGACCTTCTTGCTA
        : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
EM_EST GGTATATTTCCCTCTGGTTTGCTCAGAGTCTCGGTTGCGCTACTCATTGCACATCTTGCAA
        120     130     140     150     160     170

                                     160     170     180     190     200     210
b5.3,  CTATCGTGCATGCAAGCTTTGGAACACCTAATCTGAAAGCCCGTCTCAATACATTCCGTG
        : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
EM_EST CAATTCTTCATGCAAGCTTGAGAACACCGAAGTGAAGGCACGTTTTAACACATTTAGGG
        180     190     200     210     220     230

                                     220     230     240     250     260     270
b5.3,  AGGAATTCGTGCGGTTTGCGGCAATTACAGCGAACTGAATCACCACATCCATGGACGC
        : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
EM_EST AGGAATTCGAGCAGTATGGCGTAACACAGCGAGATTTAGAGTAATCTTGTACCACCAT
        240     250     260     270     280     290

                                     280     290     300     310     320     330
b5.3,  AAGTTGATTATGAAGAAAAGAAGGAAGTGGTATTTTGAGGGTGGACTTGCTATTGATGCT
EM_EST GATCGTGTCTGCTGAGGACATAACGCTGTAAAGNCCAAACTTACTGCCTTTTTTCCAAG
        300     310     320     330     340     350
```

Figure 16 : Homologies de séquences nucléiques obtenues pour B5.3 dans la banque ESTs.

3.1.4. Spécificité des produits B1.5 et B5.3.

Pour déterminer s'il existe une corrélation entre la présence des produits B1.5 et B5.3 et l'embryogenèse somatique, ces produits sont hybridés avec les profils de DDRT-PCR obtenus grâce aux amorces B1 et B5 respectivement, chez la chicorée "474" embryogène et chez la chicorée Pévèle non embryogène dans nos conditions de culture.

3.1.4.1. Produit B1.5.

Les produits de DDRT-PCR obtenus avec l'amorce B1 chez la chicorée "474" et chez la chicorée Pévèle sont séparés par électrophorèse et transférés sur une membrane. Ils sont ensuite hybridés avec le clone B1.5, de façon à vérifier l'accumulation différentielle du produit cloné chez la chicorée "474" et à observer son comportement chez la chicorée Pévèle.

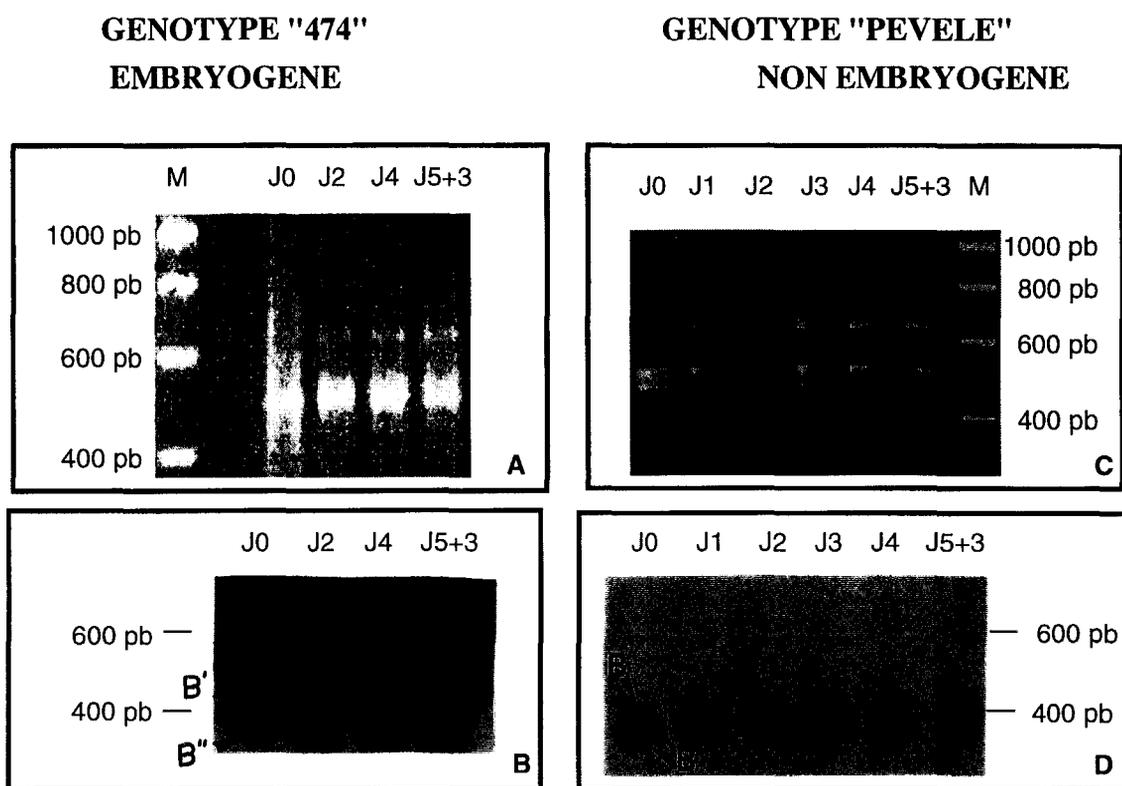


Figure 17 : Vérification de l'expression différentielle du produit de DDRT-PCR nommé B1.5.

A : Séparation en gel d'agarose des produits de DDRT-PCR obtenus avec le couple d'amorces B1/T12GC chez la chicorée "474".

B : Autoradiographie après transfert sur membrane du gel "A" et hybridation avec B1.5.

C : Séparation en gel d'agarose des produits de DDRT-PCR obtenus avec le couple d'amorces B1/T12GC chez la chicorée Pévèle.

D : Autoradiographie après transfert sur membrane du gel "C" et hybridation avec B1.5.

Chez la chicorée "474", l'hybridation réalisée avec le produit B1.5 présente pour les jours 0, 2, 4 et 5+3 de la cinétique trois bandes distinctes, l'une présentant une taille d'environ 540 pb, les deux autres ayant une taille très proche, d'environ 350 et 400 bp (figure 17, A et B). La bande de 540 pb, correspondant à notre produit et donc nommée B1.5, est plus abondamment représentée. D'une intensité faible au J0, ce produit est plus abondamment représenté au cours de l'embryogenèse somatique. B' et B'' suivent le même profil.

Chez la chicorée Pévèle, les deux bandes de 350 et 400 pb sont présentes, mais aucun signal n'est obtenu aux environs de 540 pb (figure 17, C et D).

3.1.4.2 Produit B5.3.

De la même façon, les produits de DDRT-PCR obtenus avec l'amorce B5 sont hybridés avec le clone B5.3.

**GENOTYPE "474"
EMBRYOGENE**

**GENOTYPE "PEVELE"
NON EMBRYOGENE**

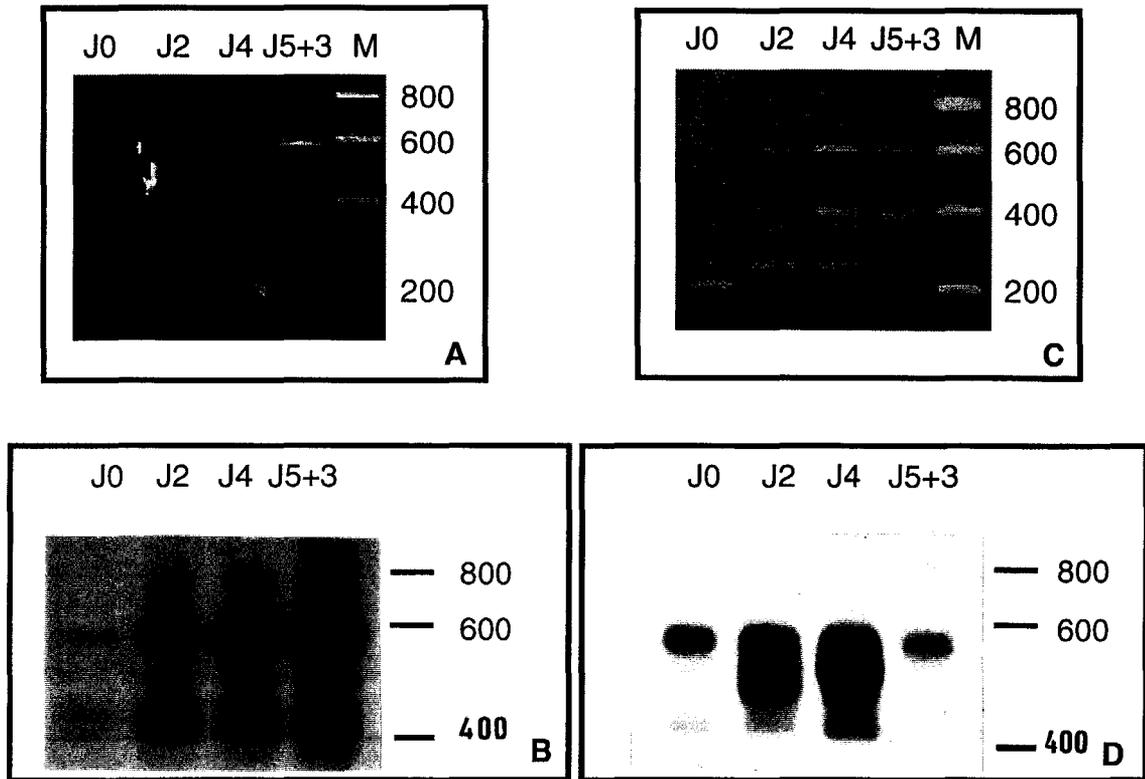


Figure 18 : Vérification de l'expression différentielle du produit de DDRT-PCR nommé B5.3.

A : Séparation en gel d'agarose des produits de DDRT-PCR obtenus avec le couple d'amorces B5/T12GC chez la chicorée "474".

B : Autoradiographie après transfert sur membrane du gel "A" et hybridation avec B5.3.

C : Séparation en gel d'agarose des produits de DDRT-PCR obtenus avec le couple d'amorces B5/T12GC chez la chicorée Pévèle.

D : Autoradiographie après transfert sur membrane du gel "C" et hybridation avec B5.3.

M : Marqueur de taille. **J0 à J5+3** : Jours de la cinétique étudiés.

Chez la chicorée "474", le profil obtenu pour B5.3 présente une bande d'environ 580 pb qui correspond au produit de DDRT-PCR isolé. Ce produit, faiblement représenté au J0, semble s'accumuler au long du processus, du J2 au J5+3 au cours de la cinétique d'embryogenèse. Un second signal d'intensité plus faible, correspondant à un produit de 430 pb, suit le même profil d'accumulation (figure 18, A et B). Chez la chicorée Pévèle, le produit de 580 pb présente en hybridation un signal d'intensité plus importante aux J2 et J4, intensité qui s'affaiblit en fin de culture (figure 18, C et D). D'autres produits de taille inférieure s'hybrident également avec la sonde B5.3.

Conclusion : par des expériences de DDRT-PCR, nous avons mis en évidence des modifications dans l'accumulation des transcrits dès les 1^{ères} étapes de l'embryogenèse somatique chez la chicorée "474". Deux produits s'accumulant de façon différentielle au cours du processus ont été isolés et clonés. Le produit B1.5, visualisé au cours de la culture en conditions d'embryogenèse somatique chez la chicorée "474", n'est pas détecté chez un témoin non embryogène. Le produit B5.3 s'accumule particulièrement chez la chicorée embryogène. Nous avons poursuivi l'étude des gènes correspondants.

Le produit B1.5 effectivement cloné ne présente pas le même profil que celui initialement visualisé sur les électrophorogrammes en gel d'acrylamide. Il est possible que le produit cloné n'est pas celui qui avait été à l'origine sélectionné. Mais il est possible qu'il y correspond bien, si l'on admet que la méthode de DDRT-PCR n'est pas quantitative.

3.2. Etude du gène B5.3.

3.2.1. Expression du gène B5.3.

Nous avons tenté de visualiser l'ARNm correspondant au gène B5.3 par des expériences de northern blot. Aucun signal n'est obtenu après une hybridation réalisée avec le produit B5.3, qu'il s'agisse de northern d'ARN totaux ou messagers.

3.2.2. Recherche des ADNc complets.

Les ADNc obtenus par DDRT-PCR correspondent à la partie 3' des ARNm dont ils proviennent. Pour obtenir des ADNc pleine longueur, nous avons utilisé le produit de DDRT-PCR B5.3 comme sonde pour cribler une banque d'ADNc. La banque d'ADNc utilisée a été réalisée par Théo Hendricks. Elle a été construite à partir d'ARNm extraits de tissus foliaires de chicorée "474" au jour 3 de la cinétique d'embryogenèse somatique

Aucun ADNc n'a été isolé avec la sonde B5.3, malgré plusieurs répétitions. Concluant à un faible taux de représentation du clone au sein de la banque, nous avons poursuivi cette étude par des expériences de RACE-PCR, qui permet de cibler le produit recherché. La RACE-PCR permet une amplification préférentielle des extrémités 5' ou 3' des ADNc codant pour un ARNm donné. Dans notre cas, nous recherchons l'extrémité 5' des ARNm, puisque les expériences de DDRT-PCR nous ont permis d'en obtenir l'extrémité 3'. Les ARNm sont reverse transcrits à partir d'une amorce polyT, les ADNc obtenus sont ensuite modifiés en 3' (ce qui correspond à la partie 5' des ARNm

dont ils sont issus) par ajout d'une queue polyC. Les étapes de PCR utilisent une amorce polyG et une amorce spécifique du gène, choisie dans la partie 3' connue grâce aux expériences de DDRT-PCR. Deux répétitions de RACE-PCR ont été réalisées à partir d'ARNm de chacun des jours de la cinétique. Les profils obtenus sont très différents d'une expérience à l'autre; seules des bandes mineures sont visualisées. L'absence de reproductibilité ne nous a pas permis de poursuivre par cette méthodologie l'étude de B5.3.

Conclusion : une étude approfondie du produit B5.3 nécessiterait une autre stratégie expérimentale, sachant que ce produit n'est pas un "faux positif", mais que le taux de transcrits est sans doute très faible.

3.3. Etude du gène B1.5.

3.3.1. Expression du gène B1.5.

3.3.1.1. Northern blots.

Nous avons vérifié la représentation différentielle des ARNm correspondants par northern blot, en utilisant comme sonde le clone B1.5.

Pour chacun des jours de la cinétique d'embryogenèse, 20 µg des ARN totaux ont été utilisés. Les autoradiographies présentent un signal d'intensité très faible au J0, suggérant un taux d'expression peu important du gène correspondant dans les tissus foliaires ou une dégradation rapide des transcrits. Le transcrit est plus abondamment représenté à partir de la mise en culture des fragments foliaires (figure 19).

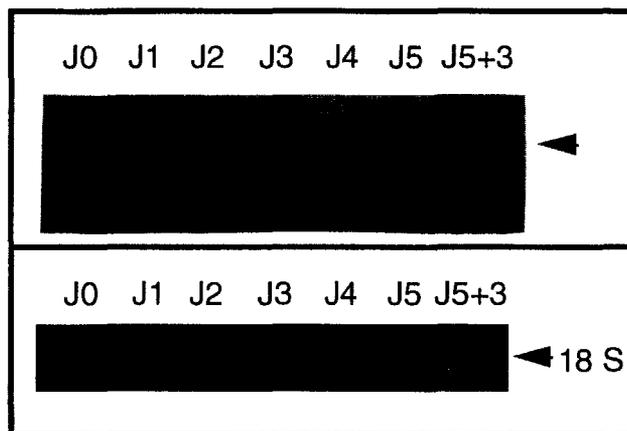


Figure 19 : Northern blot des ARN totaux extraits à chacun des jours de la cinétique d'embryogenèse somatique (J0 à J5+3).

A : hybridation avec B1.5.

B : coloration au BET de la sous-unité 18S ribosomale.

Nous avons réalisé des northern blots à partir d'1 µg d'ARNm polyadénylés pour tenter de mieux visualiser les signaux précédemment obtenus. A partir d'un gel à 1%, nous avons obtenu un signal plus net en hybridation (figure 20). Le signal obtenu au J0 représente un ARNm de poids moléculaire plus faible que celui visualisé les jours suivants de la cinétique. L'intensité la plus forte est obtenue au J1. L'utilisation d'un marqueur de poids moléculaire permet d'évaluer la taille des ARNm hybridés, situés entre 800 et 1000 pb .

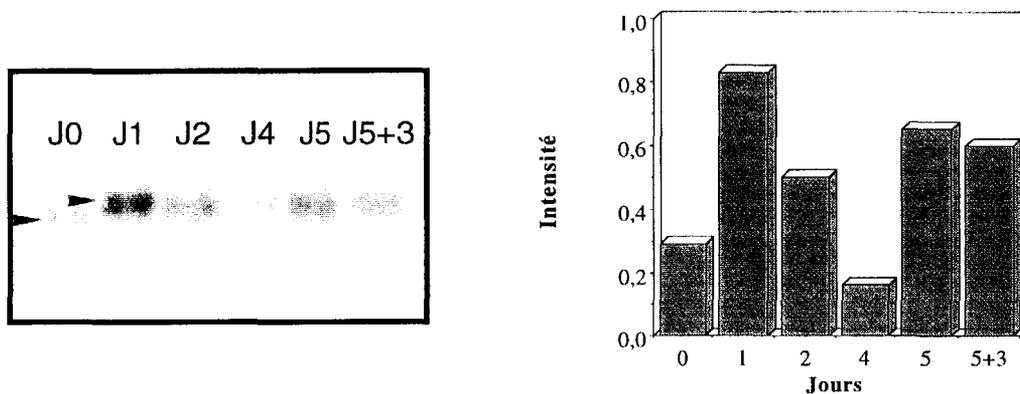


Figure 20 : Northern blot et quantification des ARNm polyadénylés extraits à chacun des jours de la cinétique (J0 à J5+3) après hybridation avec B1.5.

3.3.1.2. RT PCR non sélective.

Pour confirmer l'existence de 2 ARN différents s'hybridant avec la sonde B1.5 au cours de la cinétique, les ARNm des jours 0, 5 et 5+3 ont été transcrits de façon inverse en utilisant une amorce polyT. Les ADNc obtenus ont été modifiés au niveau de leur extrémité 5' par ajout d'une queue polyC et amplifiés de façon non sélective par PCR, en utilisant une amorce polyG et une amorce polyT.

Les produits issus de l'amplification par PCR ont été séparés sur gel d'agarose à 1,4%, transférés sur membrane et hybridés avec la sonde B1.5. L'autoradiographie (figure 21) présente 1 signal à environ 800 pb au jour 0. Au moins 2 signaux contigus, situés entre 800 et 1000 pb, sont visualisés aux jours 5 et 5+3. Par cette technique, qui augmente la représentativité des différents ARNm, et une séparation électrophorétique plus importante, nous montrons la transcription d'au moins un ARNm supplémentaire correspondant au produit B1.5 au cours de la cinétique embryogène.

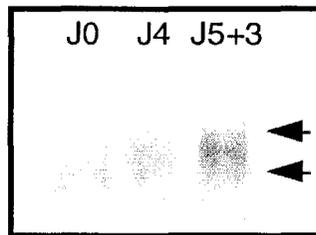


Figure 21 : Hybridation des produits de PCR-NS avec B1.5

Conclusion : Ces résultats tendent à montrer que le clone B1.5 ne correspond pas au produit de DDRT-PCR initialement sélectionné pour son accumulation amplifiée à partir du J5 de la cinétique d'embryogenèse. Deux ARNm possèdent une homologie de séquence avec ce clone; l'un est présent dans les feuilles des plantules non induites et tout au long de la cinétique, l'autre n'est transcrit qu'à partir du J1. La synthèse d'un ARNm supplémentaire en conditions d'embryogenèse a toutefois retenu notre attention; nous avons donc poursuivi l'étude du produit B1.5.

3.3.2. Obtention des ADNc complets.

3.3.2.1. Par criblage d'une banque d'ADNc.

Criblage de la banque d'ADNc.

La banque utilisée est la même que celle qui a été criblée avec le produit B5.3.

En utilisant la sonde B1.5, nous avons détecté 4 clones positifs, visualisés sur les 2 répliques réalisées. Un criblage secondaire nous a permis de les isoler et de vérifier leur affinité de séquence avec la sonde. Pour chacun des 4 clones positifs, 3 clones positifs issus du criblage secondaire sont sélectionnés, donnant au total 12 clones positifs.

Les phagemides pBluescript® contenant les inserts sont excisés du vecteur UniZAP™ (Stratagene) grâce au phage helper ExAssist™, et utilisés pour réinfecter la souche bactérienne SORL™. Pour chacun des 12 clones positifs issus du criblage secondaire, 5 colonies isolées sont sélectionnées. Une PCR utilisant les amorces M13 du plasmide permet de vérifier l'absence de clone chimérique, et d'estimer la taille des inserts.

Les colonies issues d'une même boîte contiennent toutes un insert de taille identique, et les 3 clones correspondant à chacun des clones du criblage primaire

- Résultats -

semblent identiques. Les clones 1 et 3 présentent une taille d'environ 750 pb, les clones 2 et 4 ont une taille très proche de 800 pb (figure 22).

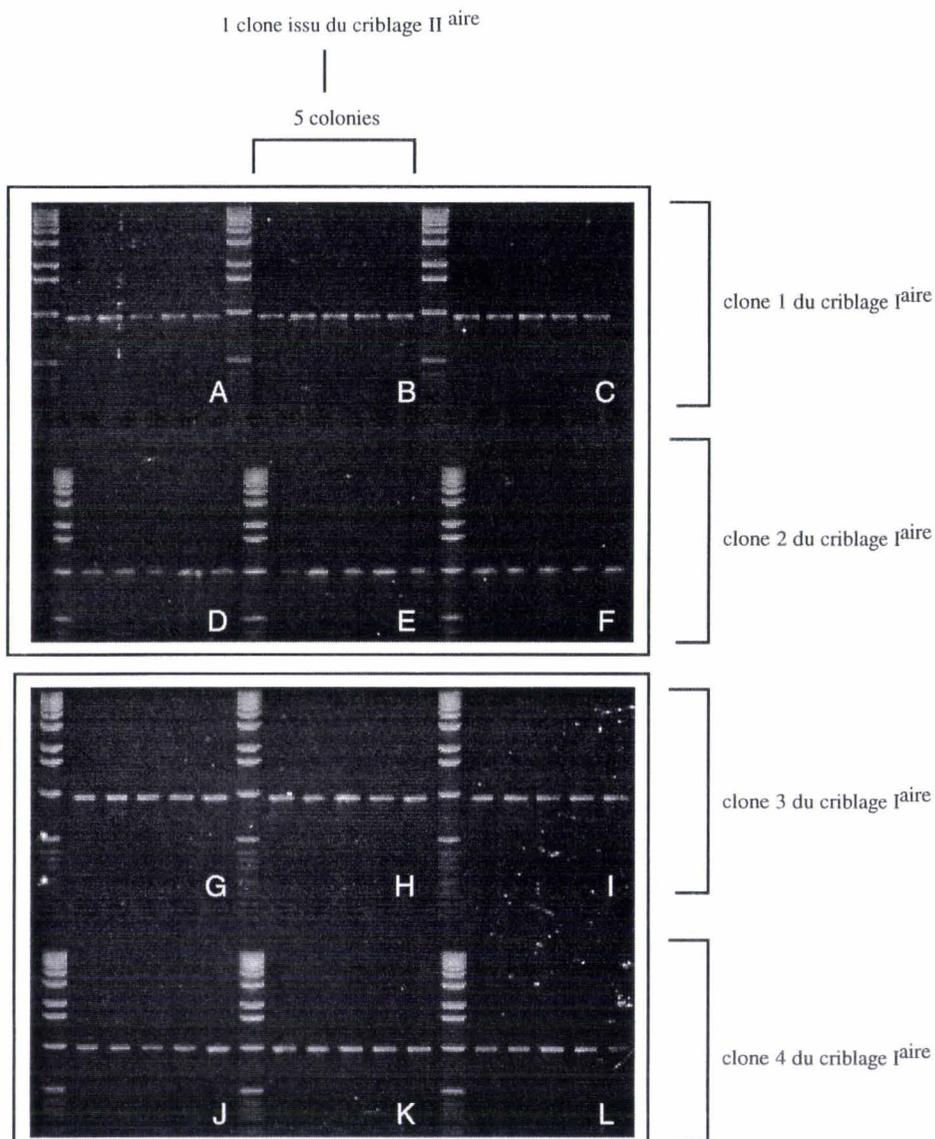


Figure 22 : Séparation électrophorétique des inserts amplifiés par PCR en utilisant les amorces M13 du plasmide.

A à L : Inserts amplifiés à partir de 5 colonies bactériennes correspondant à 1 clone issu du criblage secondaire.

Analyse des séquences des ADNc isolés.

La séquence nucléotidique de chacun des 4 clones a été déterminée. L'alignement des séquences obtenues avec le produit B1.5 est donné dans la figure 23. Les clones 1 et 3 sont composés de 743 et 749 pb, les clones 2 et 4 de 776 et 797 pb respectivement.

Le clone 4 est désigné comme référence pour la numérotation des pb. Les quatre clones présentent une homologie proche de 100% de la position 60 à la position 663.

- Résultats -

En 5', les clones 1 et 3 comportent 60 pb de moins que le clone 4. Le clone 2 comporte 10 pb de moins que le clone 4, mais l'homologie entre ces 2 clones commence en position 34.

	1				50
c11
c13
c12	ATGGATTGG	CGAGGAGAAA	ACACCTCGAT	CGTATCAATA
c14	AAAAGAAAA	CCTCTTCTT	TCGGAAAAAC	CACCTCGAT	CGTATCAATA
B1.5
Consensus
	51				100
c11	CGGACACAAT	AATCTCAACG	CAAAATTTGT	TTTGCTTGGG
c13	CGGACACAAT	AATCTCAACG	CAAAATTTGT	TTTGCTTGGG
c12	TGGCGACGAT	CGGACACAAT	AATCTCAACG	CAAAATTTGT	TTTGCTTGGG
c14	TGGCGACGAT	CGGACACAAT	AATCTCAACG	CAAAATTTGT	TTTGCTTGGG
B1.5
Consensus	cggacacaat	aatctcaacg	caaaatt.gt	tttgcttggg
	101				150
c11	GACATGGGAG	CTGGTAAATC	AAGTCTCGTG	TTGCGATTTCG	TCAAAGGCCA
c13	GACATGGGAG	CTGGTAAATC	AAGTCTCGTG	TTGCGATTTCG	TCAAAGGCCA
c12	GACATGGGAG	CTGGTAAATC	AAGTCTCGTG	TTGCGATTTCG	TCAAAGGCCA
c14	GACATGGGAG	CTGGTAAATC	AAGTCTCGTG	TTGCGATTTCG	TCAAAGGCCA
B1.5
Consensus	gacatgggag	ctggtaaatc	aagtctcgtg	ttgcgatttcg	tcaaaggcca
	151				200
c11	ATTTCTAGAA	TTCCAGGAAT	CGACGATCGG	AGCGGCGTTT	TTTTTCGCAA
c13	ATTTCTAGAA	TTCCAGGAAT	CGACGATCGG	AGCGGCGTTT	TTTTTCGCAA
c12	ATTTCTAGAA	TTCCAGGAAT	CGACGATCGG	AGCGGCGTTT	TTTTTCGCAA
c14	ATTTCTAGAA	TTCCAGGAAT	CGACGATCGG	AGCGGCGTTT	TTTTTCGCAA
B1.5
Consensus	atttctagaa	ttccaggaat	cgacgatcgg	agcggcgttt	ttttcgcaaa
	201				250
c11	CCCTAGCAGT	GAATGATGCA	ACGGTGAAAT	TCGAGATCTG	GGATACGGCG
c13	CCCTAGCAGT	GAATGATGCA	ACGGTGAAAT	TCGAGATCTG	GGATACGGCG
c12	CCCTAGCAGT	GAATGATGCA	ACGGTGAAAT	TCGAGATCTG	GGATACGGCG
c14	CCCTAGCAGT	GAATGATGCA	ACGGTGAAAT	TCGAGATCTG	GGATACGGCG
B1.5
Consensus	ccctagcagt	gaatgatgca	acggtgaaat	tcgagatctg	ggatacggcg
	251				300
c11	GGTCAAGAAA	GGTATCATAG	TCTGGCTCCT	ATGTACTACA	GGGGCGCTGC
c13	GGTCAAGAAA	GGTATCATAG	TCTGGCTCCT	ATGTACTACA	GGGGCGCTGC
c12	GGTCAAGAAA	GGTATCATAG	TCTGGCTCCT	ATGTACTACA	GGGGCGCTGC
c14	GGTCAAGAAA	GGTATCATAG	TCTGGCTCCT	ATGTACTACA	GGGGCGCTGC
B1.5G	TTTCGCTCCT	ATGTACTACA	GGGGCGCTGC
Consensus	ggtcaagaaa	ggtatcataG	TcTgGCTCCT	ATGTACTACA	GGGGCGCTGC
	301				350
c11	AGCAGCAATT	ATTGTCTACG	ATATAACTAG	CGCGGATTCA	TTTACACGGG
c13	AGCAGCAATT	ATTGTCTACG	ATATAACTAG	CGCGGATTCA	TTTACACGGG
c12	AGCAGCAATT	ATTGTCTACG	ATATAACTAG	CGCGGATTCA	TTTACACGGG
c14	AGCAGCAATT	ATTGTCTACG	ATATAACTAG	CGCGGATTCA	TTTACACGGG
B1.5	AGCAGCAATT	ATTGTCTACG	ATATCACTAG	CGCGGATTCA	TTTACACGGG
Consensus	AGCAGCAATT	ATTGTCTACG	ATATAACTAG	CGCGGATTCA	TTTACACGGG
	351				400
c11	CTAAAAAGTG	GGTTCAAGAA	CTTCAAAAAC	AAGGTAATCC	AAACATGGTA
c13	CTAAAAAGTG	GGTTCAAGAA	CTTCAAAAAC	AAGGTAATCC	AAACATGGTA
c12	CTAAAAAGTG	GGTTCAAGAA	CTTCAAAAAC	AAGGTAATCC	AAACATGGTA
c14	CTAAAAAGTG	GGTTCAAGAA	CTTCAAAAAC	AAGGTAATCC	AAACATGGTA
B1.5	CTAAAAAGTG	GGTTCAAGAA	CTTCAAAAAC	AAGGTAATCC	AAACATGGTA
Consensus	CTAAAAAGTG	GGTTCAAGAA	CTTCAAAAAC	AAGGTAATCC	AAACATGGTA
	401				450
c11	ATGGCACTTG	CTGGAAATAA	AGCTGATCTT	GAAGACAAGA	GGAAAGTAAC
c13	ATGGCACTTG	CTGGAAATAA	AGCTGATCTT	GAAGACAAGA	GGAAAGTAAC
c12	ATGGCACTTG	CTGGAAATAA	AGCTGATCTT	GAAGACAAGA	GGAAAGTAAC
c14	ATGGCACTTG	CTGGAAATAA	AGCTGATCTT	GAAGACAAGA	GGAAAGTAAC
B1.5	ATGGCACTTG	CTGGAAATAA	AGCTGATCTT	GAAGACAAA	GGAAAGTAAC
Consensus	ATGGCACTTG	CTGGAAATAA	AGCTGATCTT	GAAGACAAGa	GGaAGTAAC

- Résultats -

	451				500
c11	AGCAGAAGAA	GCACGTGTAT	ATGCTGAAGA	GAATGGTCTT	TTCTTCATGG
c13	AGCAGAAGAA	GCACGTGTAT	ATGCTGAAGA	GAATGGTCTT	TTCTTCATGG
c12	AGCAGAAGAA	GCACGTGTAT	ATGCTGAAGA	GAATGGTCTT	TTCTTCATGG
c14	AGCAGAAGAA	GCACGTGTAT	ATGCTGAAGA	GAATGGTCTT	TTCTTCATGG
B1.5	AGCAGAAGAA	GCACGTGTAT	ATGCTGAAGA	GAATGGTCTC	TTTTTCATGG
Consensus	AGCAGAAGAA	GCACGTGTAT	ATGCTGAAGA	GAATGGTCTt	TTcTTCATGG
	501				550
c11	AGACATCTGC	TAAAACTGCT	GCTAATGTTA	ATGATGTATT	TCATGAAATT
c13	AGACATCTGC	TAAAACTGCT	GCTAATGTTA	ATGATGTATT	TCATGAAATT
c12	AGACATCTGC	TAAAACTGCT	GCTAATGTTA	ATGATGTATT	TCATGAAATT
c14	AGACATCTGC	TAAAACTGCT	GCTAATGTTA	ATGATGTATT	TCATGAAATT
B1.5	AGACATCAGC	TAAAACTGCT	GCTGATGTTA	ACGACGTATT	TCATGAAATC
Consensus	AGACATctGC	TAAAACTGCT	GCTaATGTTA	AtGAtGTATT	TCATGAAATt
	551				600
c11	GCCAAGAGAC	TACCTAGAGC	TCAGCCAAC	CAGAAATCCAG	CTGGAATGGT
c13	GCCAAGAGAC	TACCTAGAGC	TCAGCCAAC	CAGAAATCCAG	CTGGAATGGT
c12	GCCAAGAGAC	TACCTAGAGC	TCAGCCAAC	CAGAAATCCAG	CTGGAATGGT
c14	GCCAAGAGAC	TACCTAGAGC	TCAGCCAAC	CAGAAATCCAG	CTGGAATGGT
B1.5	GCCAAGAGAC	TACCTAGAGC	TCAGCC'FACT	CAGAAATCCAG	CTGGCATGGT
Consensus	GCCAAGAGAC	TACCTAGAGC	TCAGCCaACT	CAGAAATCCAG	CTGGaATGGT
	601				650
c11	TCTTGTGAC	AGACCAGCTG	AAGGGGCCCG	TGCTGCATCA	TGCTGTTTCAT
c13	TCTTGTGAC	AGACCAGCTG	AAGGGGCCCG	TGCTGCATCA	TGCTGTTTCAT
c12	TCTTGTGAC	AGACCAGCTG	AAGGGGCCCG	TGCTGCATCA	TGCTGTTTCAT
c14	TCTTGTGAC	AGACCAGCTG	AAGGGGCCCG	TGCTGCATCA	TGCTGTTTCAT
B1.5	TCTTGTGAC	AGACCAGCTG	AAGGGGCCCG	TGCTGCATCA	TGCTGTTTCAT
Consensus	TCTTGTGAC	AGACCAGCTG	AAGGGGCCCG	TGCTGCATCA	TGCTGTTTCAT
	651				700
c11	AAGTAATGTT	TTTTAATTCT	TTGATTGATG	ATGTTTTTAG	. .TTTgTTTT
c13	AAGTAATGTT	TTT .AATTCT	TTGATTGATA	ATGTTTTTAT	GTTTTTTTT
c12	AAGTAATGTT	TTT .TATTCT	TTGATTGATA	ATGTTTTTAG	. .TTTgTTTT
c14	AAGTAATGTT	TTT .AATTCT	G .GATTGATA	ATGTTTTTAG	. .TTTgTTTT
B1.5	AAGTAATGTT	TTT .AATTCT	T .GATTGATG	ATGTTTTTAG	. .TTTgTTTT
Consensus	AAGTAATGTT	TTT .aATTCT	t .GATTGATg	ATGTTTTtag	. .TTTgTTTT
	701				750
c11	TATGTGTATT	T .GTCATTGG	AGA . .TTACG	GGAATATCAT	GAAAATCTTT
c13	TATGTGTATT	TTGTTATTTG	AAG . .TTACG	GGA .TATTAT	GAAATTCAT
c12	TG . .GTATT	T . .CCATTGG	AGA . .TTACG	GGAATATCAT	GAAAATTTTT
c14	TATGTGTATT	T .GTCATTGG	AAGATTTACG	GGAATATCAT	GAAAATTTTT
B1.5	TATGTGTATT	T .GTCATTGG	AAGA .TTACG	GGAATATCAT	GAAAAT .TTG
Consensus	TatgtGTATT	T .gtcATTgG	Aaga .TTACG	GGAaTATcAt	GAAAAt .Ttt
	751				800
c11	ATGTCAATAA	AAAT . .GTT	AAAGGTGTAA	GTTGTTCTAA	AAAAAAAAAA
c13	TT . .TATAA	AAAA . .TTT	AAAGG .GTAA	GTTGTTCTAA	AAAAAAAAAA
c12	ATGTCA .TAA	AAAAGT .TTA	AAGGGGTAA	AAAAAAAAAA	AAAAAAAAA .
c14	ATGTCAATAA	AAAAATGTTA	AAGGGGTAA	GTTGTTCAAA	AAAAAAAAAA
B1.5	ATGTCAATAA	AAAAAT .GTT	AAAGGTGCA
Consensus	aTgtcaaTAA	AAAA . .gTt	AAaGGtGtAaaa	aaaaaaaa .
	801		820		
c11	AAAAAAAAAA	A			
c13	AAAAAAAAAA	AAAAAAAAAA			
c12			
c14	AAA			
B1.5			
Consensus			

Figure 23 : Aligement des séquences des clones issus de la banque d'ADNc de J3 avec le produit de DDRT-PCR B1.5.

En 3', les différences observées peuvent être dues à des erreurs de lecture des gels de séquences. Seul un séquençage à partir de l'extrémité 5' a été possible, les séquences obtenues à partir de l'extrémité 3' étant toujours illisibles. Ce séquençage dans un seul sens rend difficile une correction de la partie 3', souvent trouble et d'intensité plus faible.

Toutefois, le clone 2 possède une partie 3' plus courte que les 3 autres clones, ce qui est principalement visualisé sur les gels de séquences par une queue polyadénylée débutant plus rapidement.

La traduction en acides aminés de ces 4 séquences montre qu'il n'existe qu'un seul cadre de lecture possible. Ces 4 séquences protéiques sont identiques. Toutefois, les séquences des clones 1 et 3 semblent incomplètes en 5'; elles comportent 4 acides aminés de moins que la séquence des clones 2 et 4. La séquence protéique la plus longue est comparée à celles existant dans les banques de données, les homologies les plus importantes sont obtenues avec des protéines de liaison au GTP de type rab5 de *Lotus japonicus* (98%) et *Vicia faba* (97%). Les alignements obtenus sont présentés dans la figure 24.

	1				50
c14	MATIGHNNLN	AKLVLLGDMG	AGKSSLVLR	VKGQFLEFQE	STIGAAFFSQ
Lotus	MATIGHNNLN	AKLVLLGDMG	AGKSSLVLR	VKGQFLEFQE	STIGAAFFSQ
Vicia	MATIGHNNLN	AKLVLLGDMG	AGKSSLVLR	VKGQFLEFQE	STIGAAFFSQ
Consensus	MATIGHNNLN	AKLVLLGDMG	AGKSSLVLR	VKGQFLEFQE	STIGAAFFSQ
					100
c14	TLAVNDATVK	FEIWDTAGQE	RYHSLAPMY	RGAAAAIIVY	DITSADSFTR
Lotus	TLAVNDATVK	FEIWDTAGQE	RYHSLAPMY	RGAAAAIIVY	DITSSDSFTR
Vicia	TLAVNDATVK	FEIWDTAGQE	RYHSLAPMY	RGAAAAIIVY	DITSSDSFTR
Consensus	TLAVNDATVK	FEIWDTAGQE	RYHSLAPMY	RGAAAAIIVY	DITSADSFTR
	101				150
c14	AKKWVQELQK	QGNPNMVMAL	AGNKADLEDK	RKVTAEEARV	YAEENGLFFM
Lotus	AKKWVQELQK	QGNPNMVMAL	AGNKADLEDK	RKVTAEEARV	YAEENGLFFM
Vicia	AKKWVQELQK	QGNPNMVMAL	TGNKSDLEDK	RKVTAEEARV	YAEENGLFFM
Consensus	AKKWVQELQK	QGNPNMVMAL	aGNKaDLEDK	RKVTA#EARV	YAEENGLFFM
	151				200
c14	ETSAKTAANV	NDVFHEIAKR	LPRAQPTQNP	AGMVLVDRPA	EGARAASCCS
Lotus	ETSAKTAANV	NDVFYEIAKR	LPRAQPAQNP	AGMVLVDRPA	EGARASSCCS
Vicia	ETSAKSAANV	NDVFYEIAKR	LPRAQPAQNP	AGMVLVDRPT	EGSRAASCCS
Consensus	ETSAKtAANV	NDVFhEIAKR	LPRAQPtQNP	AGMVLVDRPa	EGaRaASCCS

Figure 24 : Alignement de la séquence protéique déduite du clone 4 issu de la banque d'ADNc de J3 avec les séquences de protéines de liaison au GTP de *Lotus japonicus* et *Vicia faba*.

Conclusion : Nous avons donc isolé de la banque d'ADNc 4 clones potentiellement différents, correspondant au produit de DDRT-PCR nommé B1.5. Bien que leur séquence codante soit identique, les clones 2 et 4 sont distincts puisque la partie 5' non codante présente des différences. Au vu des alignements obtenus, les séquences des clones 1 et 3 semblent incomplètes dans leur partie 5'.

3.3.2.2. Par RACE-PCR.

Pour tenter d'obtenir la partie 5' manquante des clones 1 et 3, nous avons réalisé des expériences de RACE-PCR à partir d'ARNm isolés des fragments foliaires de chicorée "474". Ces expériences ont été également réalisées chez la chicorée Pévèle non embryogène, cultivée en conditions d'embryogenèse, pour estimer la relation entre les produits obtenus et l'embryogenèse somatique.

Chez la chicorée "474".

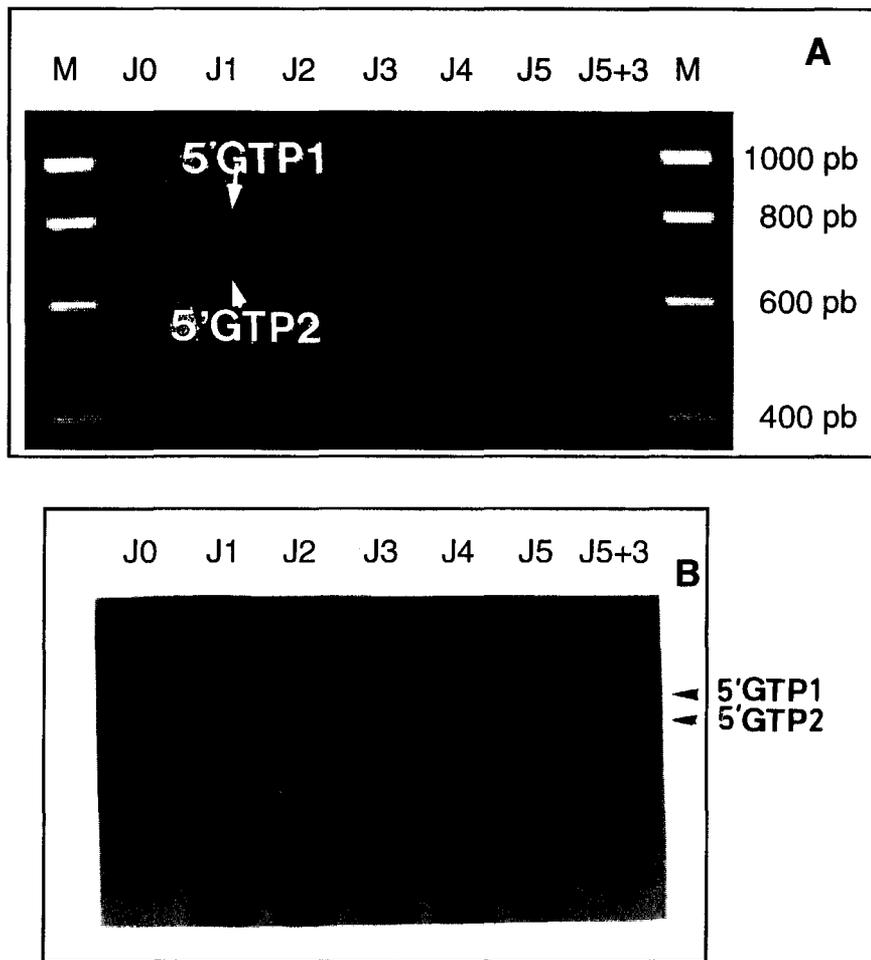
L'amorce choisie correspond à une séquence qui existe à la fois dans le produit de DDRT-PCR obtenu avec l'amorce B1 et dans les différents clones isolés de la banque grâce à ce produit. Elle est composée de la fin de la séquence codante complétée d'une partie de la séquence non codante en 3'. La RACE-PCR a été réalisée à partir d'ARNm de J0, J1, J2, J3, J4, J5 et J5+3 de la cinétique d'embryogenèse, pour tenter de distinguer les produits correspondant aux deux ARNm visualisés par northern blot (§1.1).

Les produits de RACE-PCR sont séparés sur un gel d'agarose (figure 25, A). Une bande majeure d'environ 670 pb, nommée 5'GTP2, est présente à chacun des jours de la cinétique. Trois autres bandes apparaissent dès le 1^{er} jour d'induction de l'embryogenèse, dont une bande majeure d'environ 790 pb nommée 5'GTP1, et 2 bandes mineures situées entre 5'GTP1 et 5'GTP2. L'hybridation de ces produits avec la sonde B1.5 montre une homologie de séquence de ces 4 bandes avec le clone B1.5 (figure 25, B).

Figure 25 : Résultats des expériences de RACE-PCR chez la chicorée "474".
J0 à J5+3 : Jours de la cinétique d'embryogenèse étudiés. M : Marqueur de taille.
A : Séparation électrophorétique en gel d'agarose des produits de RACE-PCR .
B : Autoradiographie après transfert sur membrane des produits de RACE-PCR et hybridation avec B1.5.



- Résultats -



Les 4 bandes sont mieux visualisées sur la figure 26.

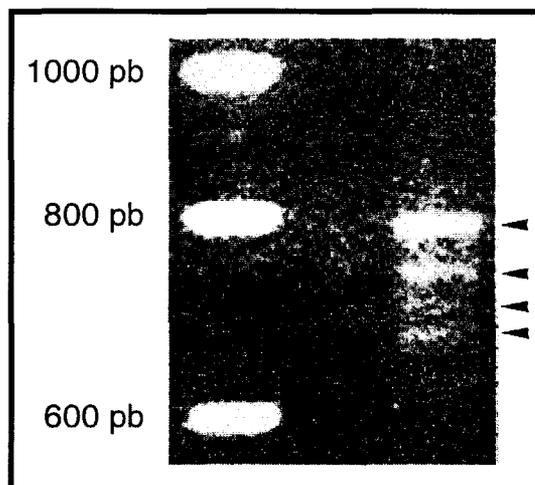


Figure 26 : Electrophorèse en gel d'agarose des produits de RACE-PCR obtenus au J1 de la cinétique d'embryogenèse chez de la chicorée "474".

- Résultats -

Les produits de RACE-PCR obtenus au 5^{ème} jour de la cinétique d'embryogenèse sont clonés. Parmi les bactéries transformées, 4 clones potentiellement différents sont séparés; l'insert est amplifié par PCR (figure 27) et séquencé.

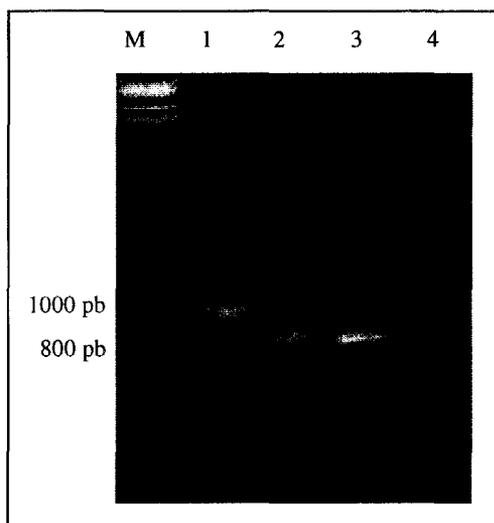


Figure 27 : Séparation électrophorétique des clones 1 à 4 issus de RACE-PCR après amplification avec les amorces M13 du plasmide (+ 226 pb / à la taille réelle). M : marqueur de taille.

Les séquences obtenues sont présentées dans la figure 28. Elles sont bordées par les amorces utilisées pour la RACE-PCR. La séquence 1 comporte 785 pb. Elle est nommée 5'GTP1. Les séquences 2, 3 et 4 sont identiques; elles comportent 669 pb et sont désignées 5'GTP2.

	1		50
5'GTP1	GGGGAATCGG	GGGGGGGGGC	GTATTGCTCA CATTTTAATA TCGACGACGT
5'GTP2	GGGGAATCGG	GGGGGGGGG
Consensus	GGGGAaTCGG	GGGGGGGGG
	51		100
5'GTP1	TACACCATCT	GTCCGCCAC	CCCATCTTTG TTTCAGCAGG CAACAACAAC
5'GTP2
Consensus
	101		150
5'GTP1	AACAACATAC	TGCGTCTCTT	ACTCAAAAAG AAACCTCTTT CTTTTCGGAA
5'GTP2CTCTTT CTTTTCGGAA
ConsensusCTCTTT CTTTTCGGAA
	151		200
5'GTP1	AACCACCCTC	GATCGTATCA	ATATGGCGAC GATCGGACAC AATAATCTCA
5'GTP2	AACCACCCTC	GATCGTATCA	ATATGGCGAC GATCGGACAC AATAATCTCA
Consensus	AACCACCCTC	GATCGTATCA	ATATGGCGAC GATCGGACAC AATAATCTCA
	201		250
5'GTP1	ACGCAAAAT	GGTTTGTCTT	GGGGACATGG GAGCTGGTAA ATCAAGTCTG
5'GTP2	ACGCAAAAT	GGTTTGTCTT	GGGGACATGG GAGCTGGTAA ATCAAGTCTC
Consensus	ACGCAAAAT	GGTTTGTCTT	GGGGACATGG GAGCTGGTAA ATCAAGTCTC

- Résultats -

	251				300
5'GTP1	GTGTTGCGAT	TCGTCAAAGG	CCAATTTCTA	GAATTCAGG	AATCGACGAT
5'GTP2	GTGTTGCTAT	TCGTCAAAGG	CCAATTTCTA	GAATTCAGG	AATCGACGAT
Consensus	GTGTTGCGAT	TCGTCAAAGG	CCAATTTCTA	GAATTCAGG	AATCGACGAT
	301				350
5'GTP1	CGGAGCGGCG	TTTTTTTCGC	AAACCCTAGT	AGTGAATGAT	GCAACGGTGA
5'GTP2	CGGAGCGGCG	TTTTTTTCGC	AAACCCTAGC	AGTGAATGAT	GCAACGGTGA
Consensus	CGGAGCGGCG	TTTTTTTCGC	AAACCCTAGc	AGTGAATGAT	GCAACGGTGA
	351				400
5'GTP1	AATTCGAGAT	CTGGGATACG	GCGGGTCAAG	AAAGGTATCA	TAGTCTCGCT
5'GTP2	AATTCGAGAT	CTGGGATACG	GCGGGTCAAG	AAAGGTATCA	TAGTCTGGCT
Consensus	AATTCGAGAT	CTGGGATACG	GCGGGTCAAG	AAAGGTATCA	TAGTCTcGCT
	401				450
5'GTP1	CCTATGTACT	ACAGGGGCGC	TGCAGCAGCA	ATTATTGTCT	ACGATATCAC
5'GTP2	CCTATGTACT	ACAGGGGCGC	TGCAGCAGCA	ATTATTGTCT	ACGATATAAC
Consensus	CCTATGTACT	ACAGGGGCGC	TGCAGCAGCA	ATTATTGTCT	ACGATATaAC
	451				500
5'GTP1	TAGCGCGGAT	TCATTTACAC	GGGCTAAAAA	GTGGGTTCAA	GAAC'TTCAAA
5'GTP2	TAGCGCGGAT	TCATTTACAC	GGGCTAAAAA	GTGGGTTCAA	GAAC'TTCAAA
Consensus	TAGCGCGGAT	TCATTTACAC	GGGCTAAAAA	GTGGGTTCAA	GAAC'TTCAAA
	501				550
5'GTP1	AACAAGGTAA	TCCAACATG	GTAATGGCAC	TTGCTGGAAA	TAAAGCTGAT
5'GTP2	AACAAGGTAA	TCCAACATG	GTAATGGCAC	TTGCTGGAAA	TAAAGCTGAT
Consensus	AACAAGGTAA	TCCAACATG	GTAATGGCAC	TTGCTGGAAA	TAAAGCTGAT
	551				600
5'GTP1	CTTGAAGACA	AGAGGAAAGT	AACAGTAGAA	GAAGCACGTG	TATATGCTGA
5'GTP2	CTTGAAGACA	AGAGGAAAGT	AACAGCAGAA	GAAGCACGTG	TATATGCTGA
Consensus	CTTGAAGACA	AGAGGAAAGT	AACAGcAGAA	GAAGCACGTG	TATATGCTGA
	601				650
5'GTP1	AGAGAATGGT	CTCTTTTCTCA	TGGAGACATC	AGCTAAAAC	GCTGCTAATG
5'GTP2	AGAGAATGGT	CTTTTCTTCA	TGGAGACATC	TGCTAAAAC	GCTGCTAATG
Consensus	AGAGAATGGT	CTcTTcTTCA	TGGAGACATC	aGCTAAAAC	GCTGCTAATG
	651				700
5'GTP1	TTAATGATGT	ATTTTCATGAA	ATCGCCAAGA	GACTACCTAG	AGCTCAGCCA
5'GTP2	TTAATGATGT	ATTTTCATGAA	ATTGCCAAGA	GACTACCTAG	AGCTCAGCCA
Consensus	TTAATGATGT	ATTTTCATGAA	ATcGCCAAGA	GACTACCTAG	AGCTCAGCCA
	701				750
5'GTP1	ACTCAGAATC	CAGCTGGAAT	GGTCTTGTT	GACAGACCAG	CTGAAGGGGC
5'GTP2	ACTCAGAATC	CAGCTGGAAT	GGTCTTGTT	GACAGACCAG	CTGAAGGGGC
Consensus	ACTCAGAATC	CAGCTGGAAT	GGTCTTGTT	GACAGACCAG	CTGAAGGGGC
	751			786	
5'GTP1	CCGTGCTGCA	TCATGCTGTT	CATAAGTAAT	GTTTTT	
5'GTP2	CCGTGCTGCA	TCATGCTGTT	CATAAGTAAT	GTTT..	
Consensus	CCGTGCTGCA	TCATGCTGTT	CATAAGTAAT	GTTT..	

Figure 28 : Alignement des séquences 5'GTP1 et 5'GTP2 obtenues par RACE-PCR.

Les amorces utilisées sont notées en caractères gras.

Chez un témoin non embryogène.

Par des expériences de RACE-PCR similaires, nous avons suivi l'accumulation des transcrits correspondant aux produits 5'GTP1 et 5'GTP2 chez la chicorée Pévèle, ne produisant pas d'embryons somatiques dans nos conditions de culture. Les résultats sont présentés dans les figures 29 A et B.

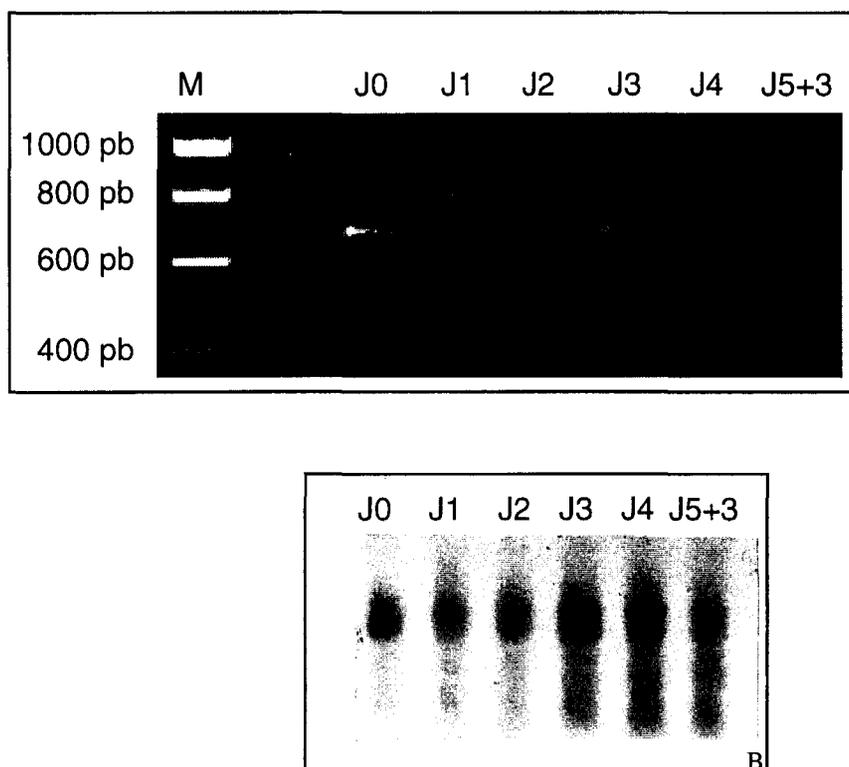


Figure 29 : Résultats des expériences de RACE-PCR chez la chicorée Pévèle.
A : Séparation électrophorétique en gel d'agarose des produits de RACE-PCR.
B : Autoradiographie des produits de RACE-PCR après transfert sur membrane et hybridation avec B1.5.
J0 à J5+3 : Jours de la cinétique d'embryogenèse étudiés. M : Marqueur de taille.

5'GTP1 présente le même profil d'accumulation chez la chicorée Pévèle et chez la chicorée "474" embryogène. Absent des feuilles de plantules non induites, il est visualisé dès le 1^{er} jour de culture en conditions d'embryogenèse.

A l'inverse, 5'GTP2 n'est plus représenté à partir du 4^{ème} jour de la cinétique chez Pévèle, alors qu'il est présent de façon constante chez la chicorée "474".

Conclusion : par ces expériences de RACE-PCR, nous avons isolé la partie 5' de deux séquences de type rab5, et confirmé l'existence de plusieurs produits correspondant au produit B1.5 obtenu par DDRT-PCR.

3.3.2.3. Analyse des séquences complètes.

Reconstitution des séquences complètes.

2 séquences complètes, nommées GTP1 et GTP2 sont reconstituées, en alignant les séquences issues de RACE-PCR avec celle obtenue par DDRT-PCR, c'est à dire le

- Résultats -

fragment B1.5 et le clone le plus long issu de la banque (clone 4). La séquence GTP2 comporte 786 pb (figure 30), GTP1 en comporte 901 (figure 31).

	CT	CTT	TCT	TTT	CGG	AAA	ACC	ACC	CTC	GAT	CGT	ATC	AAT	ATG	GCG	ACG	ATC	M	A	T	I
				11			20			29			38								47
G	H	N	N	L	N	A	K	L	V	L	L	G	D	M	G	A	G				
GGA	CAC	AAT	AAT	CTC	AAC	GCA	AAA	TTG	GTT	TTG	CTT	GCG	GAC	ATG	GGA	GCT	GGT				
		59			68			77			86			95			104				
K	S	S	L	V	L	L	F	V	K	G	Q	F	L	E	F	Q	E				
AAA	TCA	AGT	CTC	GTG	TTG	CTA	TTC	GTC	AAA	GGC	CAA	TTT	CTA	GAA	TTC	CAG	GAA				
		113			122			131			140			149			158				
S	T	I	G	A	A	F	F	S	Q	T	L	A	V	N	D	A	T				
TCG	ACG	ATC	GGA	GCG	GCG	TTT	TTT	TCG	CAA	ACC	CTA	GCA	GTG	AAT	GAT	GCA	ACG				
		167			176			185			194			203			212				
V	K	F	E	I	W	D	T	A	G	Q	E	R	Y	H	S	L	A				
GTG	AAA	TTC	GAG	ATC	TGG	GAT	ACG	GCG	GGT	CAA	GAA	AGG	TAT	CAT	AGT	CTG	GCT				
		221			230			239			248			257			266				
P	M	Y	Y	R	G	A	A	A	A	I	I	V	Y	D	I	T	S				
CCT	ATG	TAC	TAC	AGG	GGC	GCT	GCA	GCA	GCA	ATT	ATT	GTC	TAC	GAT	ATA	ACT	AGC				
		275			284			293			302			311			320				
A	D	S	F	T	R	A	K	K	W	V	Q	E	L	Q	K	Q	G				
GCG	GAT	TCA	TTT	ACA	CGG	GCT	AAA	AAG	TGG	GTT	CAA	GAA	CTT	CAA	AAA	CAA	GGT				
		329			338			347			356			365			374				
N	P	N	M	V	M	A	L	A	G	N	K	A	D	L	E	D	K				
AAT	CCA	AAC	ATG	GTA	ATG	GCA	CTT	GCT	GGA	AAT	AAA	GCT	GAT	CTT	GAA	GAC	AAG				
		383			392			401			410			419			428				
R	K	V	T	A	E	E	A	R	V	Y	A	E	E	N	G	L	F				
AGG	AAA	GTA	ACA	GCA	GAA	GAA	GCA	CGT	GTA	TAT	GCT	GAA	GAG	AAT	GGT	CTT	TTC				
		437			446			455			464			473			482				
F	M	E	T	S	A	K	T	A	A	N	V	N	D	V	F	H	E				
TTC	ATG	GAG	ACA	TCT	GCT	AAA	ACT	GCT	GCT	AAT	GTT	AAT	GAT	GTA	TTT	CAT	GAA				
		491			500			509			518			527			536				
I	A	K	R	L	P	R	A	Q	P	T	Q	N	P	A	G	M	V				
ATT	GCC	AAG	AGA	CTA	CCT	AGA	GCT	CAG	CCA	ACT	CAG	AAT	CCA	GCT	GGA	ATG	GTT				
		545			554			563			572			581			590				
L	V	D	R	P	A	E	G	A	R	A	A	S	C	C	S	.					
CTT	GTT	GAC	AGA	CCA	GCT	GAA	GGG	GCC	CGT	GCT	GCA	TCA	TGC	TGT	TCA	TAA	GTA				
		599			608			617			626			635			644				
ATG	TTT	TTA	ATT	CTG	GAT	TGA	TAA	TGT	TTT	AGT	TTG	TTT	TTA	TGT	GTA	TTT	GTC				
		653			662			671			680			689			698				
ATT	GGA	AGA	TTT	ACG	GGA	ATA	TCA	TGA	AAA	TTT	TTA	TGT	CAA	TAA	AAA	AAT	GTT				
		707			716			725			734			743			752				
AAA	GGG	TGT	AAG	TTG	TTC	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	A										
		761			770			779													

Figure 30 : Séquence de GTP2. La séquence codante est notée en caractères gras. Les acides aminés correspondants apparaissent au-dessus de chaque codon.

- Résultats -

```

CGT ATT GCT CAC ATT TTA ATA TCG ACG ACG TTA CAC CAT CTG TCC GCC
          9          18          27          36          45

CAC CCC ATC TTT GTT TCA GCA GGC AAC AAC AAC AAC ATA CTG CGT CTC TTA
          57          66          75          84          93          102

CTC AAA AAG AAA CCT CTT TCT TTT CGG AAA ACC ACC CTC GAT CGT ATC AAT ATG
          111          120          129          138          147          156
M

A T I G H N N L N A K L V L L G D M
GCG ACG ATC GGA CAC AAT AAT CTC AAC GCA AAA TTG GTT TTG CTT GGG GAC ATG
          165          174          183          192          201          210

G A G K S S L V L R F V K G Q F L E
GGA GCT GGT AAA TCA AGT CTG GTG TTG CGA TTC GTC AAA GGC CAA TTT CTA GAA
          219          228          237          246          255          264

F Q E S T I G A A F F S Q T L V V N
TTC CAG GAA TCG ACG ATC GGA GCG GCG TTT TTT TCG CAA ACC CTA GTA GTG AAT
          273          282          291          300          309          318

D A T V K F E I W D T A G Q E R Y H
GAT GCA ACG GTG AAA TTC GAG ATC TGG GAT ACG GCG GGT CAA GAA AGG TAT CAT
          327          336          345          354          363          372

S L A P M Y Y R G A A A A I I V Y D
AGT CTC GCT CCT ATG TAC TAC AGG GGC GCT GCA GCA GCA ATT ATT GTC TAC GAT
          381          390          399          408          417          426

I T S A D S F T R A K K W V Q E L Q
ATC ACT AGC GCG GAT TCA TTT ACA CGG GCT AAA AAG TGG GTT CAA GAA CTT CAA
          435          444          453          462          471          480

K Q G N P N M V M A L A G N K A D L
AAA CAA GGT AAT CCA AAC ATG GTA ATG GCA CTT GCT GGA AAT AAA GCT GAT CTT
          489          498          507          516          525          534

E D K R K V T V E E A R V Y A E E N
GAA GAC AAG AGG AAA GTA ACA GTA GAA GAA GCA CGT GTA TAT GCT GAA GAG AAT
          543          552          561          570          579          588

G L F F M E T S A K T A A N V N D V
GGT CTC TTT TTC ATG GAG ACA TCA GCT AAA ACT GCT GCT AAT GTT AAT GAT GTA
          597          606          615          624          633          642

F H E I A K R L P R A Q P T Q N P A
TTT CAT GAA ATC GCC AAG AGA CTA CCT AGA GCT CAG CCA ACT CAG AAT CCA GCT
          651          660          669          678          687          696

G M V L V D R P A E G A R A A S C C
GGA ATG GTT CTT GTT GAC AGA CCA GCT GAA GGG GCC CGT GCT GCA TCA TGC TGT
          705          714          723          732          741          750

S
TCA TAA GTA ATG TTT TTA ATT CTG GAT TGA TAA TGT TTT AGT TTG TTT TTA TGT
          759          768          777          786          795          804

GTA TTT GTC ATT GGA AGA TTT ACG GGA ATA TCA TGA AAA TTT TTA TGT CAA TAA
          813          822          831          840          849          858

AAA AAT GTT AAA GGG TGT AAG TTG TTC AAA AAA AAA AAA AAA A
          867          876          885          894

```

Figure 31 : Séquence de GTP1. La séquence codante est notée en caractères gras. Les acides aminés correspondants apparaissent au-dessus de chaque codon.

-Séquence codante.

Les 2 séquences contiennent un cadre de lecture ouvert de 600 pb compris entre le premier codon initiateur ATG rencontré et le codon stop TAA. Au sein de cette partie codante, ces 2 séquences diffèrent par 10 nucléotides (figure 32).

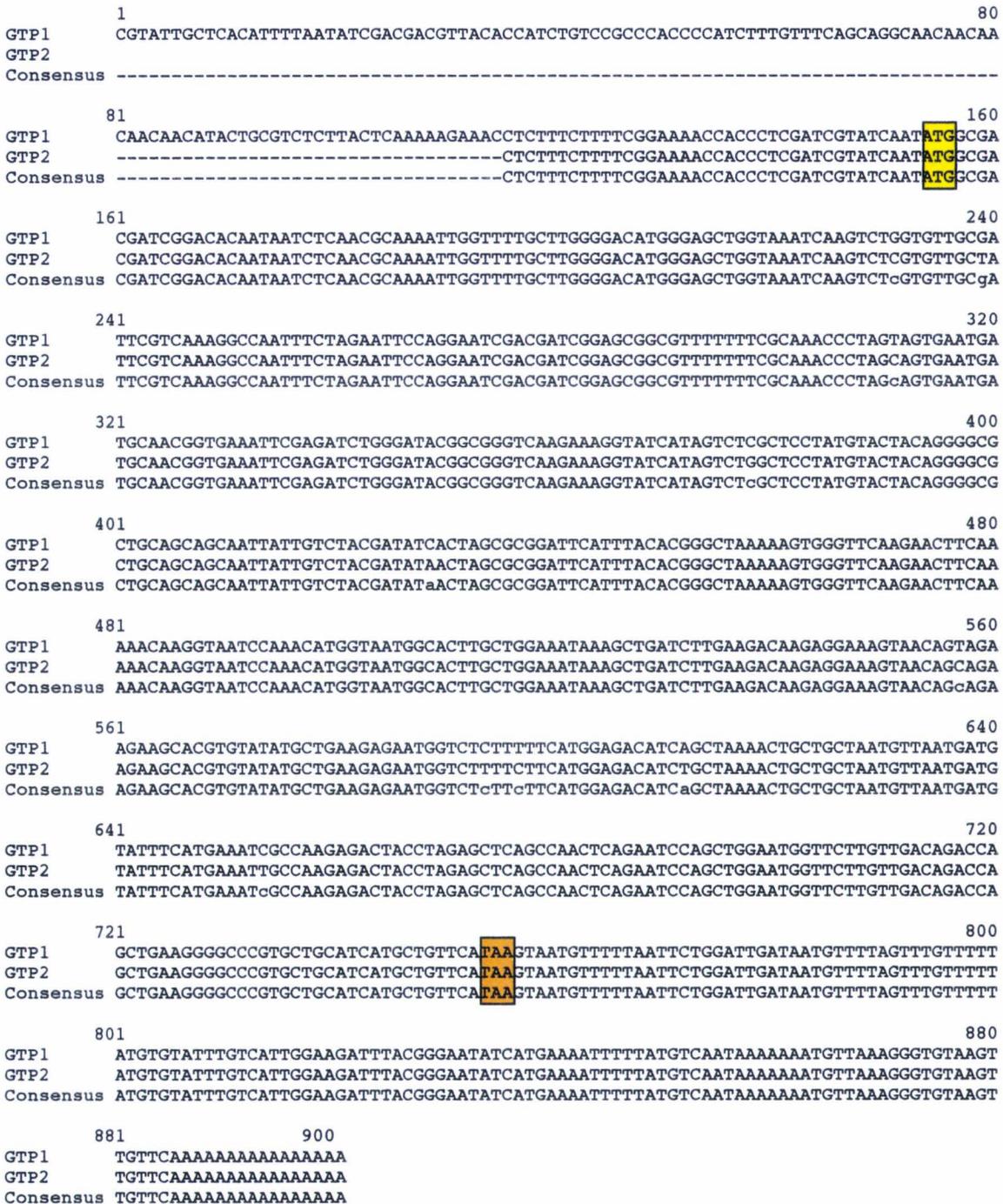


Figure 32 : Alignement des séquences nucléiques GTP1 et GTP2. Le codon ATG initiateur de traduction figure en jaune, le codon stop apparaît en orange.

-Partie 3' non codante.

Pour les 2 séquences nucléotidiques obtenues, codant potentiellement pour des protéines de liaison au GTP, 129 pb séparent la queue polyadénylée du codon stop TAA. Un signal de polyadénylation AATAAA est situé en position 854 à partir du début de la séquence de GTP1, soit 98 pb après le codon stop.

-Partie 5' non codante.

GTP1 possède en son extrémité 5' 153 nucléotides situés à l'extérieur de la séquence codante. GTP2 en comporte 38. Ces 38 pb ont communes aux 2 ADNc.

Caractéristiques des séquences protéiques déduites.

Les séquences protéiques déduites GTP1 et GTP2 comportent chacune 200 acides aminés. Elles diffèrent par 3 acides aminés (figure 33). GTP1 a une masse moléculaire estimée à 21881 Da et un point isoélectrique théorique de 6,84. GTP2 a une masse moléculaire de 21782 Da et un pHi de 6,31.

	1				50
GTP1	MATIGHNNLN	AKLVLLGDMG	AGKSSLVIRF	VKGQFLEFQE	STIGAAFFSQ
GTP2	MATIGHNNLN	AKLVLLGDMG	AGKSSLVILF	VKGQFLEFQE	STIGAAFFSQ
Consensus	MATIGHNNLN	AKLVLLGDMG	AGKSSLVIRF	VKGQFLEFQE	STIGAAFFSQ
	51				100
GTP1	TLVAVNDATVK	FEIWDTAGQE	RYHSLAPMY	RGAAAAIIVY	DITSADSFTR
GTP2	TLVAVNDATVK	FEIWDTAGQE	RYHSLAPMY	RGAAAAIIVY	DITSADSFTR
Consensus	TLVAVNDATVK	FEIWDTAGQE	RYHSLAPMY	RGAAAAIIVY	DITSADSFTR
	101				150
GTP1	AKKWQELQK	QGNPNVMAL	AGNKADLEDK	RKVTVEEARV	YAEENGLFFM
GTP2	AKKWQELQK	QGNPNVMAL	AGNKADLEDK	RKVTAEEARV	YAEENGLFFM
Consensus	AKKWQELQK	QGNPNVMAL	AGNKADLEDK	RKVTVEEARV	YAEENGLFFM
	151				200
GTP1	ETSAKTAANV	NDVFHEIAKR	LPRAQPTQNP	AGMVLVDRPA	EGARAASCCS
GTP2	ETSAKTAANV	NDVFHEIAKR	LPRAQPTQNP	AGMVLVDRPA	EGARAASCCS
Consensus	ETSAKTAANV	NDVFHEIAKR	LPRAQPTQNP	AGMVLVDRPA	EGARAASCCS

Figure 33 : Alignement des séquences protéiques déduites de GTP1 et GTP2. Les différences sont colorées.

GTP1 et GTP2 ayant une composition en acides aminés très proche, les homologies obtenues dans les banques de données pour ces deux protéines sont très peu différentes. Globalement, les séquences protéiques GTP1 et GTP2 sont homologues à 98% (et identiques à 96%) à la protéine rab5A de *Lotus japonicus*, et à 98% (avec une identité de

Six domaines sont très conservés chez les protéines de type rab (figure 35). Les domaines I (GDMGAGKS) et III (WDTAG) sont des sites de liaison au phosphate. Les domaines IV (GNKAD) et V (ETSA) sont les sites de liaison de la protéine à la guanine. Le domaine II, domaine effecteur, interagit avec d'autres protéines dites effectrices. Le domaine VI (SCCS) comporte des cystéines, impliquées dans l'isoprénylation post-transcriptionnelle, nécessaire pour l'accrochage de la protéine à la membrane. Ces domaines sont présents chez GTP1 et GTP2 (figure 34).

Elles présentent également des homologies importantes avec les protéines rab5 du règne animal; les plus importantes sont données dans le tableau 4.

Organisme	Appellation	Identité (%)	Homologie (%)
<i>Lotus japonicus</i>	Lj-rab5A	95	97
<i>Vicia faba</i>	SMG ras-related	95	97
<i>Nicotiana plumbaginifolia</i>	rhn1	89	93
<i>Nicotiana tabacum</i>	Nt-rab5	88	94
<i>Nicotiana tabacum</i>	SMG ras-related	82	90
<i>Arabidopsis thaliana</i>	SMG	78	88
<i>Arabidopsis thaliana</i>	rha1	79	87
<i>Caenorhabditis elegans</i>	rab5	66	79
<i>Canis familiaris</i>	rab5C	63	76
<i>Rattus norvegicus</i>	SMG rab5	63	77
<i>Gallus gallus</i>	rab5C-like	62	77
<i>Homo sapiens</i>	rab5C	63	76

Tableau 4 : Comparaison de la séquence GTP1 avec celles contenues dans la banque de données nr, réalisée par l'intermédiaire du logiciel BLASTP version 2.0.8 (Altschul et al., 1997) accessible à partir du serveur du NCBI.

Conclusion : Nous avons obtenu deux séquences nucléotidiques codant potentiellement pour des petites protéines de liaison au GTP de type rab5. Ces séquences comportent la séquence codante entière. Elles proviennent de la synthèse des résultats de DDRT-PCR et de RACE-PCR. A l'issue de ce travail, nous pouvons donc confirmer le fait que les clones 1 et 3 issus de la banque d'ADNc de J3 étaient incomplets. En ce qui concerne le clone 4, la partie de séquence non traduite en 5' est intermédiaire en taille par rapport à celle de GTP1 et GTP2. Ce clone correspondrait donc à l'un des deux produits visualisés par RACE-PCR, dont la taille est située entre celle de GTP1 et celle de GTP2. Quant au clone 2, la partie 5' non codante de sa séquence qui le caractérisait par rapport au clone 4 n'est pas retrouvée chez les deux

séquences obtenues par RACE-PCR. Peut-être correspond-t-il également à l'un des deux produits de RACE-PCR de taille intermédiaire que nous ne sommes pas parvenu à cloner.

3.3.3. Représentation génomique.

Nous avons tenté de réaliser des expériences de Southern blot. Toutefois, il semble que l'ADN génomique de la chicorée "474" que nous avons extrait n'était pas suffisamment pur pour permettre des digestions enzymatiques complètes.

Pour préciser le nombre de gènes impliqués, nous avons amplifié l'ADN génomique de l'hybride "474" de chicorée en utilisant un couple d'amorces choisies à partir de la séquence de l'ADNc GTP1. Les amorces et les zones protéiques qu'elles représentent sont données dans la figure 36. Les résultats obtenus après séparation sur gel d'agarose sont présentés dans la figure 37.

```
CGTATTGCTCACATTTTAATATCGACGACGTTACACCATCTGTCCGCCACCCCATCT
TTGTTTTAGCAGGCAACAACAACAACATACTGCGTCTCTTACTCAAAAAGAAACC
TCTTTCTTTTCGGAAAACCACCCTCGATCGTATCAATATGGCGACGATCGGACACAAT
AATCTCAACGCAAAATTGGTTTTGCTTGGGGACATGGGAGCTGGTAAATCAAGTCTGG L
G D M G A G K
TGTTGCGATTTCGTCAAAGGCCAATTTCTAGAATTCAGGAATCGACGATCGGAGCGGC
GTTTTTTTCGCAAACCCTAGTAGTGAATGATGCAACGGTGAAATTCGAGATCTGGGAT
ACGGCGGGTCAAGAAAGGTATCATAGTCTCGCTCCTATGTACTACAGGGGCGCTGCAG
CAGCAATTATTGTCTACGATATCACTAGCGGGAATTCATTACACGGGCTAAAAAGTG R
S F T R A K K
GGTTCAAGAACTTCAAAAACAAGGTAATCCAAACATGGTAATGGCACTTGCTGGAAT
AAAGCTGATCTTGAAGACAAGAGGAAAGTAACAGTAGAAGAAGCACGTGTATATGCTG
AAGAGAATGGTCTCTTTTTTCATGGAGACATCAGCTAAAACCTGCTGCTAATGTTAATGA
TGTATTTTCATGAAATCGCCAAGAGACTACCTAGAGCTCAGCCAACTCAGAATCCAGCT
GGAATGGTTCTTGTGACAGACCAGCTGAAGGGGCCCGTGCTGCATCATGCTGTTTCAT
AAGTAATGTTTTTAATTCTGGATTGATAATGTTTTAGTTTTGTTTTTATGTGTATTGTG
CATTGGAAGATTTACGGGAATATCATGAAAATTTTTATGTCAATAAAAAAATGTTAAA
GGGTGTAAGTTGTTCAAAAAAAAAAAAAAAAAA
```

Figure 36 : Séquence nucléotidique de GTP1. Les amorces utilisées pour amplifier l'ADN génomique de la chicorée "474" sont surlignées.

- Résultats -

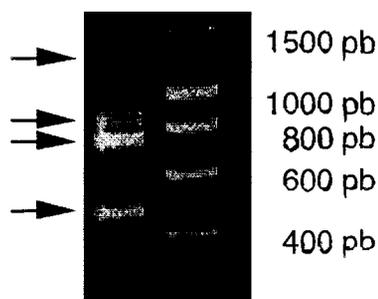


Figure 37 : Séparation électrophorétique des produits de PCR obtenus à partir d'ADN génomique de la chicorée "474" avec le couple d'amorces représentées sur la figure 36.

Le tableau 5 récapitule les tailles des fragments génomiques amplifiés et la taille théorique du produit sans intron. Quatre bandes sont visualisées. Au moins 4 gènes codant potentiellement pour des petites protéines de liaison au GTP sont ainsi mis en évidence. Chacun comporte au moins un intron, puisqu'aucun produit n'a la taille théorique évaluée à partir de l'ADNc.

Taille attendue	Tailles approximatives obtenues
252 pb	460 pb, 760 pb, 870 pb, 1300 pb

Tableau 5 : Taille des fragments d'ADN génomique obtenus après amplification par PCR.

Les fragments obtenus ont été clonés et soumis à un séquençage.

Seules les séquences de 3 des 4 fragments visualisés ont été obtenues. Le fragment d'ADN génomique partiel de 468 pb est nommé GGTP0, celui de 757 pb est nommé GGTP9 et celui de 873 pb est nommé GGTP8. Le fragment de 1300 pb n'a pas été retrouvé.

Leurs séquences nucléotidiques ont été alignées avec celles des ADNc GTP1 et GTP2. Ces alignements ont révélé que chacune des séquences génomiques partielles comporte deux introns, qui occupent les mêmes sites, mais qui diffèrent par leur séquence nucléotidique et par leur taille.

Les séquences codantes des ADN génomiques partiels GGTP0, GGTP8 et GGTP9 ont ensuite été alignées (figure 38).

```

GGTP8ssi      GGGAGCTGGTAAATCAAGTCTCGTGTTGCGATTTCGTCAAAGGCCAATTTCTAGAATTCCA
GGTP9ssi      GGGAGCTGGTAAATCAAGTCTGGTGTTGCGATTTCGTCAAAGGCCAATTTCTAGAATTCCA
GGTP0ssi      GGGAGCTGGTAAATCAAGTCTCGTTTTACGCTTCGTCAAAGGCCAATTTCTAGAATTCCA
***** ** ** * *****

GGTP8ssi      GGAATCGACGATCGGAGCGGCGTTTTTTTCGCAAACCTAGCAGTGAATGATGCAACGGT
GGTP9ssi      GGAATCGACGATCGGAGCGGCGTTTTTTTCGCAAACCTAGCAGTGAATGATGCAACGGT
GGTP0ssi      GGAATCGACAATCGGCGCGCCTTCTTTTTTCGCAAACCTTAGCGGTAAACGATGCAACGGT
***** ** ** * *****

GGTP8ssi      GAAATTCGAGATCTGGGATACGGCGGGTCAAGAAAGGTATCATAGCTCGCTCCATGTA
GGTP9ssi      GAAATTCGAGATCTGGGATACGGCGGGTCAAGAAAGGTATCATAGCTCGCTCCATGTA
GGTP0ssi      GAAATTTGAGATATGGGATACGGCGGGTCAAGAAAGGTATCATAGCTCGCTCCATGTA
***** ** ** * *****

GGTP8ssi      CTACAGGGGCGCTGCAGCAGCAATTATTGTCTACGATATAACTAGCGCGGATTCATTAC
GGTP9ssi      CTACAGGGGCGCTGCAGCAGCAATTATTGTCTACGATATAACTAGCGCGGATTCATTAC
GGTP0ssi      CTACAGAGGCGCTGCTGCGGCATTATTGTCTACGATATAACTAGCGTGGATTCATTAC
***** ** ** * *****

GGTP8ssi      ACGGGCTAAAA
GGTP9ssi      ACGGGCTAAAA
GGTP0ssi      ACGGGCTAAAA
*****
    
```

Figure 38 : Alignement des séquences codantes génomiques partielles des clones GGTP0, GGTP8 et GGTP9 (ssi : sans intron). Les pb identiques sont représentées en noir, les pb différentes apparaissent en couleur.

Ainsi, GGTP0 et GGTP8 diffèrent par 23 pb sur 251 pb totales, GGTP0 et GGTP9 diffèrent par 24 pb. GGTP8 et GGTP9 ne diffèrent que par 3 pb.

Nous avons aligné les séquences protéiques partielles déduites des séquences génomiques codantes des clones GGTP0, GGTP8 et GGTP9 (figure 39).

```

GGTP8      GAGKSSLVLRVFKGQFLEFQESTIGAAFFSQTLAVNDATVKFEIWDTAGQERYHSLAPMY
GGTP9      GAGKSSLVLRVFKGQFLEFQESTIGAAFFSQTLAVNDATVKFEIWDTAGQERYHSLAPMY
GGTP0      GAGKSSLVLRVFKGQFLEFQESTIGAAFFSQTLAVNDATVKFEIWDTAGQERYHSLAPMY
*****

GGTP8      YRGAAAAIIVYDITSADSFTRAK
GGTP9      YRGAAAAIIVYDITSADSFTRAK
GGTP0      YRGAAAAIIVYDITSVDSFTRAK
*****
    
```

Figure 39 : Alignement des séquences protéiques déduites des séquences des clones GGTP0, GGTP8 et GGTP9. Les acides aminés identiques apparaissent en noir, les acides aminés différents apparaissent en couleur.

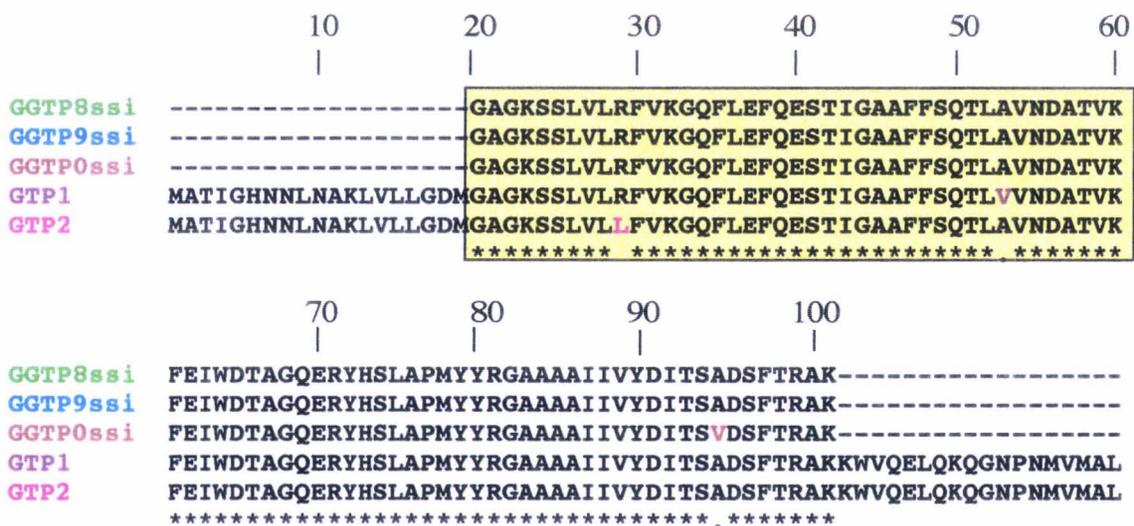
Les séquences protéiques de GGTP8 et GGTP9 présentent une identité de 100%. Un seul acide aminé distingue la séquence de GGTP0 de ces deux séquences, A (Alanine) et V (Valine) appartenant à la même famille d'acides aminés. Nous avons ensuite aligné les séquences codantes génomiques GGTP0, GGTP8 et GGTP9 avec les séquences des ADNc GTP1 et GTP2. Le tableau 6 présente les différences observées.

Comparaison	Nb de différences (pb/252 pb)
GGTP0 _{ssi} /GTP1	25
GGTP0 _{ssi} /GTP2	24
GGTP _{ssi8} /GTP1	4
GGTP8 _{ssi} /GTP2	1
GGTP9 _{ssi} /GTP1	1
GGTP9 _{ssi} /GTP2	4

Tableau 6 : Nombre de paires de bases différentes observées après alignement des séquences génomiques partielles sans intron GGTP0, GGTP8 et GGTP9 avec les séquences des ADNc GTP1 et GTP2.

L'ADN génomique partiel GGTP0 est le plus éloigné des ADNc GTP1 et GTP2 puisqu'il diffère de ces 2 ADNc par 25 et 24 pb respectivement. A l'inverse, l'ADN génomique partiel GGTP8 est le plus homologue à l'ADNc GTP2, et GGTP9 est le plus homologue à GTP1, puisqu'une seule différence est observée au niveau nucléotidique dans les 2 cas.

Les alignements de ces séquences protéiques avec celles déduites des ADNc GTP1 et GTP2 sont présentés dans la figure 40.



```
GGTP8ssi -----  
GGTP9ssi -----  
GGTP0ssi -----  
GTP1      AGNKADLEDKRKVTVEEARVYAEENGLFFMETSAKTAAVNDVFHEIAKRLPRAQPTQNP  
GTP2      AGNKADLEDKRKVTAEEARVYAEENGLFFMETSAKTAAVNDVFHEIAKRLPRAQPTQNP  
  
GGTP8ssi -----  
GGTP9ssi -----  
GGTP0ssi -----  
GTP1      AGMVLVDRPAEGARAASCCS  
GTP2      AGMVLVDRPAEGARAASCCS
```

Figure 40 : Alignement des séquences protéiques déduites des séquences codantes des clones génomiques GGTP0, GGTP8, GGTP9 et des ADNc GTP1 et GTP2. La zone commune aux séquences génomiques partielles et aux ADNc est surlignée en jaune; les paires de bases différentes apparaissent en couleur.

Dans la zone qui leur est commune, seules des différences ponctuelles sont observées entre les séquences génomiques et celles des ADNc. On note ainsi qu'en position 29, seule la séquence de GTP2 présente une leucine, alors que les autres séquences présentent une arginine. Il en est de même en position 53, où toutes les séquences comportent une alanine, alors que GTP1 comporte une valine. La séquence du clone génomique GGTP0 diffère des autres séquences en position 95, où une alanine est échangée contre une valine.

Conclusion : 3 clones correspondant à des fragments d'ADN génomique ont été isolés. Ils diffèrent principalement par la taille et la composition nucléotidique des 2 introns qu'ils comportent. Les séquences codantes des clones GGTP8 et GGTP9 ne diffèrent que par 3 nucléotides, mais représentent les mêmes séquences protéiques. Il n'existe qu'une seule différence nucléotidique entre GGTP8 et l'ADNc GTP2, autant qu'entre GGTP9 et l'ADNc GTP1. Ainsi, au vu des alignements, les ADNc GTP1 et GTP2 semblent correspondre à 2 séquences génomiques distinctes.

QUATRIEME PARTIE

DISCUSSION

DISCUSSION

1. EXPRESSION DES GENES.

Dans la synthèse bibliographique introduisant ce travail, nous avons vu que la mise en place d'une embryogenèse somatique reste difficile à caractériser tant au niveau biochimique que moléculaire. Les études pionnières dans ce domaine concernaient principalement le déroulement du développement embryonnaire plutôt que les modalités d'induction d'une embryogenèse somatique. Contrairement à l'embryon zygotique qui se développe au sein des tissus maternels, l'embryon somatique est facilement accessible, ce qui en fait un modèle d'étude intéressant des mécanismes de différenciation, d'autant qu'il semble suivre les mêmes étapes morphologiques que son homologue zygotique (Zimmerman, 1993). Cependant, la singularité de ce processus morphogène réside principalement dans l'impossibilité de modélisation de son déterminisme, ce qui a orienté certaines recherches vers les événements précoces liés à l'induction de l'embryogenèse somatique. Sa complexité apparente suggère une reprogrammation de l'expression de nombreux gènes. A l'heure actuelle, encore peu de protéines ou de gènes se sont révélés directement impliqués dans ce processus.

Notre étude s'inscrit dans le cadre des recherches visant à caractériser les étapes précoces menant à une embryogenèse somatique. L'opportunité du modèle chicorée réside dans sa capacité à développer une embryogenèse directe et d'origine unicellulaire. Ces particularités facilitent l'accès aux modifications cellulaires et moléculaires qui induisent ou accompagnent l'embryogenèse somatique.

Dans les tissus foliaires de la chicorée "474", au moins 15 polypeptides sont nouvellement détectés à partir du 3^{ème} jour d'induction de l'embryogenèse somatique ; d'autres s'accumulent différemment au cours de la cinétique embryogène (Boyer et al., 1993).

In *vivo*, la biosynthèse d'un polypeptide est le résultat de plusieurs étapes successives et modulables.

En effet, deux niveaux de régulation peuvent affecter l'expression d'un gène :

- la régulation transcriptionnelle détermine la transcription du gène en ARNm,
- la régulation post-transcriptionnelle concerne la traduction de l'ARNm en protéine et les modifications post-traductionnelles potentielles de cette protéine (figure 38).

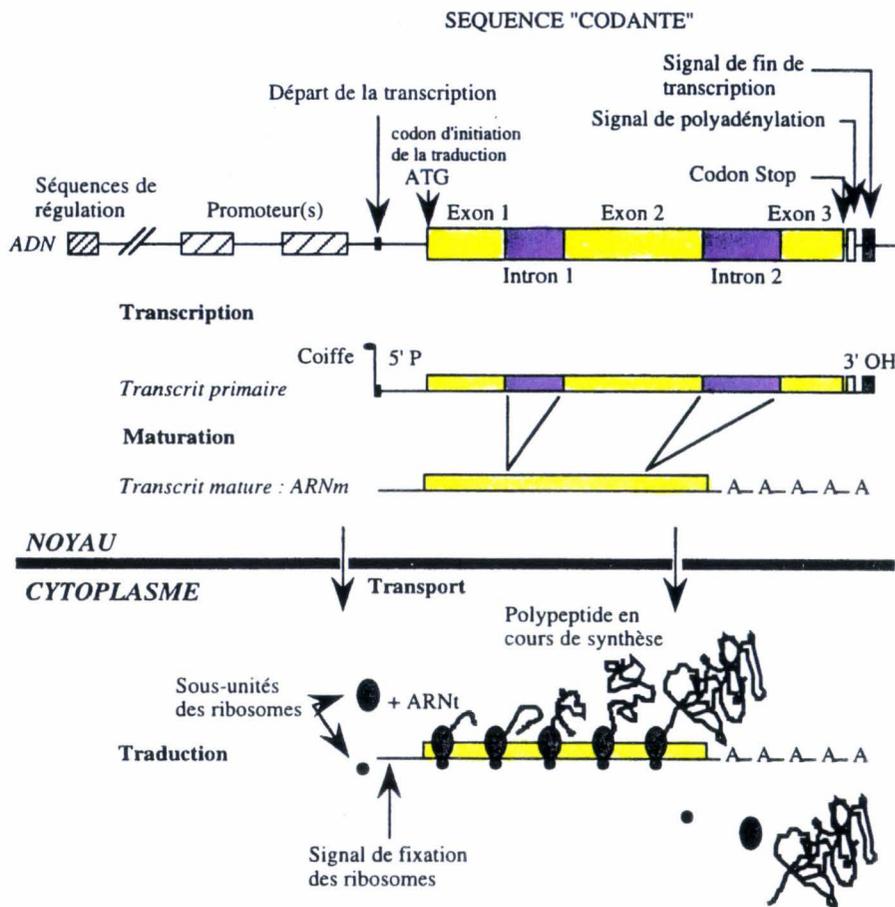


Figure 38 : schéma représentant les principales étapes de l'expression d'un gène (d'après Tagu, 1999).

Par un marquage *in vivo* des protéines néosynthétisées, nous pouvons évaluer les modifications globales qui affectent la synthèse protéique, alors qu'une traduction *in vitro* des ARNm permet d'apprécier les modifications intervenant dans l'accumulation des transcrits, puisque les polypeptides obtenus sont le reflet direct de la population d'ARNm présents à un moment donné. Appliquées à différents jours de la cinétique d'embryogenèse somatique chez la chicorée "474", ces techniques nous ont permis d'observer les remaniements affectant l'expression des gènes lors de la mise en place d'un tel processus.

Ainsi, seules 50% des protéines visualisées après marquage *in vivo* sont communes entre deux jours successifs de la cinétique d'embryogenèse somatique chez la chicorée. Les 50% restants sont composés de protéines qui sont spécifiques de l'un ou l'autre jour de la cinétique. Paradoxalement chez la carotte, alors que l'embryogenèse somatique implique une étape supplémentaire de multiplication cellulaire sans

différentiation, très peu de différences sont observées dans la synthèse des protéines. Seules 2% des protéines sont affectées (Racusen et Schiavone, 1990). Toutefois, ces auteurs insistent sur l'existence d'une régulation temporelle et spatiale de l'expression de certains gènes, indétectable lors d'une analyse globale des protéines synthétisées. Chez la chicorée, l'utilisation de l'outil informatique augmente la lisibilité des profils et permet de détecter des modifications subtiles dans la synthèse des polypeptides. De plus, notre analyse montre l'importance de la synthèse transitoire de nombreuses protéines au cours de l'induction de l'embryogenèse, visualisable uniquement lors d'une étude cinétique. Ces modifications dans l'expression des gènes peuvent se manifester dès la transcription des ARNm, ce que nous avons mis en évidence par une traduction *in vitro* des ARNm.

Alors que les résultats présentés par Reinbothe et al. (1992, a et b) suggèrent une faible altération de l'expression génique au cours de l'induction de l'embryogenèse somatique chez *Digitalis lanata* et *Nicotiana plumbaginifolia*, nos travaux chez la chicorée montrent que de nombreux gènes sont transcrits de façon différentielle au cours de la cinétique étudiée. Après 24 heures d'induction, le profil de traduction *in vitro* des ARNm est très différent de celui correspondant à des fragments foliaires non induits. Seuls 22% des spots sont communs à ces deux jours. Pour les jours suivants de la cinétique la proportion des modifications est moins importante, mais globalement, très peu d'ARNm sont présents de façon constante tout au long du processus. Ceux retrouvés de J0 à J5 correspondent à des gènes qui ne sont influencés ni par l'environnement auquel sont soumis les explants foliaires, ni par l'état physiologique de ces explants. Ils sont appelés gènes domestiques ("housekeeping genes"). Certains ARNm sont de moins en moins représentés ou disparaissent au cours de la cinétique. Supposés liés au fonctionnement de la feuille en conditions physiologiques normales, la mise en culture ne nécessite plus leur synthèse. D'autres ARNm sont présents dès le J1 et leur synthèse semble stabilisée jusqu'au J5. Enfin, certains apparaissent ou sont de plus en plus représentés au cours de l'embryogenèse. Ceci traduit une augmentation du taux de transcription, ou une dégradation moins rapide des transcrits. Les modifications les plus importantes apparaissent à la transition J2/J3, c'est-à-dire lors de la réactivation cellulaire, et à la transition J4/J5, étape qui correspond à la formation des embryons. Mais le lien existant entre les modifications observées et le processus d'embryogenèse somatique *sensus stricto* n'est pas évident. Toutes les protéines et ARNm dont la synthèse est modifiée au cours de l'induction de l'embryogenèse somatique sont susceptibles d'être impliquées dans le processus. La complexité de la mise en place d'une embryogenèse somatique au niveau cellulaire reflète donc bien un remaniement drastique du programme d'expression génique. L'induction d'une embryogenèse somatique est définie comme un passage des cellules par un état de réactivation, qui conduit à l'expression de la compétence cellulaire à l'embryogenèse somatique. Ces manifestations exigent un stress, souvent inhérent à la mise en culture elle-même.

Chez les végétaux, la notion de stress a été définie par observation *in planta* de l'effet de divers facteurs environnementaux. Deux conceptions s'en dégagent : la première correspond à un stress activateur, non dommageable voire bénéfique pour la plante, et la seconde est représentée par un stress plus sévère, qui a pour résultante un effet négatif sur la plante. Ces deux conceptions, extrapolées à la culture *in vitro*, définiraient ainsi le devenir des explants. Un stress très important induirait une mort cellulaire, alors qu'un stress plus modéré conduirait à une adaptation des cellules aux conditions environnementales et déclencherait une réponse morphogène au traitement appliqué.

Liechtenthaler (1988) a ainsi formulé la définition d'un stress non dommageable : " A mild stress may activate cell metabolism, increase the physiological activity of a plant, and does not cause any damaging effects even at a long duration. Such mild stimulating stress is favorable for the plant".

De nombreux stress, tels que la chaleur, le froid, diverses carences ou l'application de fortes concentrations d'hormones stimulent l'expression de la totipotence cellulaire nécessaire à la constitution de l'embryon somatique (Emons, 1994, Biofutur, 1996). Chez la carotte, une embryogenèse somatique peut même être obtenue après un traitement avec des chlorures de métaux lourds (Kiyosue et al., 1990). L'embryogenèse somatique apparaît donc souvent comme la résultante de l'application d'un stress déclencheur, et s'accompagne de la synthèse de différentes molécules plus ou moins impliquées dans le processus. Ce stress régulerait donc l'expression de certains gènes. Dans le système chicorée, l'environnement physico-chimique auquel sont soumis les explants foliaires diffère fortement des conditions initiales de culture des plantules (figure 39). Elles sont optimisées de façon à ne pas induire la nécrose des tissus. La température oriente particulièrement la morphogenèse chez cet hybride. Une température de 35°C permet une induction rapide de l'embryogenèse, alors qu'une température de 25°C favorise un bourgeonnement adventif. A 25°C toutefois, des embryons sont également induits, mais plus tardivement et en quantité moins importante. La synthèse d'une protéine de choc thermique est corrélée avec l'application de cette température de 35°C (Décout et al., 1998.). Des PR-protéines (PR pour Pathogenesis Related) sont également synthétisées au cours de l'embryogenèse somatique (Helleboid, 1999).

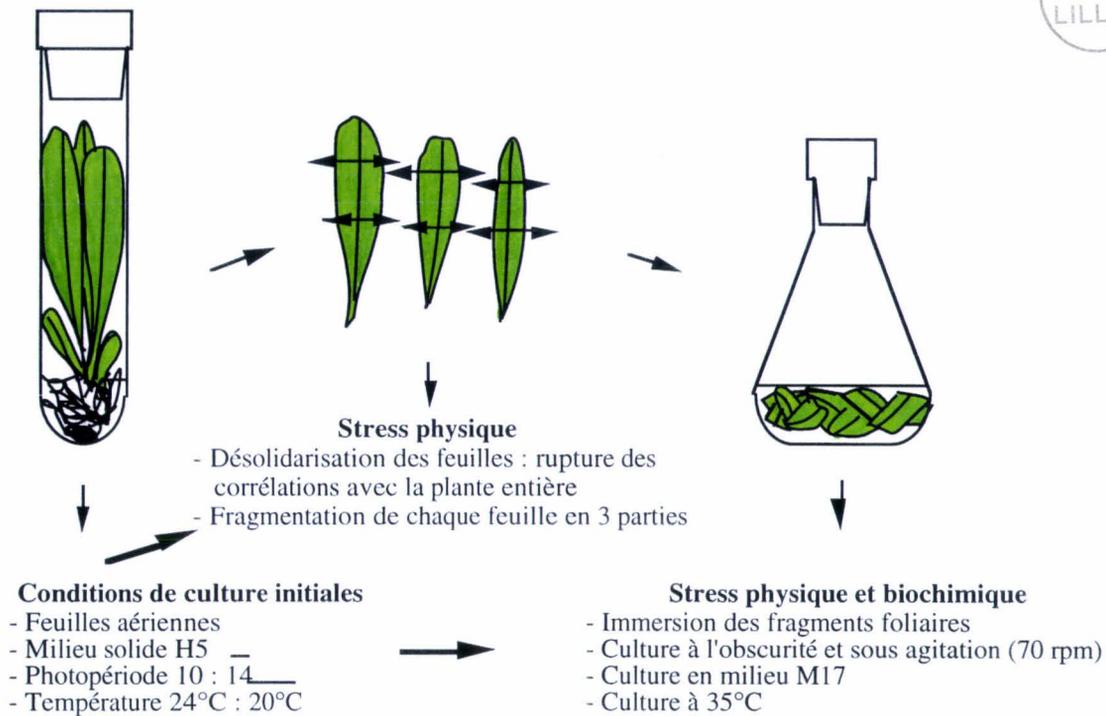


Figure 39 : stress engendrés par la culture en conditions embryogènes.

Un reprogrammation importante intervient donc dans l'expression des gènes, dès la mise en culture des explants foliaires. Le métabolisme des fragments foliaires est modifié dès les 1^{ers} jours de culture, ce que nous visualisons par une augmentation du nombre des ARNm transcrits. Ces modifications apparaissent avant toute morphogénèse aux sein des tissus cultivés. L'identification de certains de ces gènes et l'évaluation de leur degré d'implication dans l'embryogénèse somatique nécessite la mise en place d'une autre méthodologie que la traduction *in vitro* ou le marquage *in vivo*, méthodologie qui doit permettre l'exploitation des différences observées dans l'accumulation des transcrits.

2. ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DE GENES EXPRIMES DIFFERENTIELLEMENT.

La technique du DDRT-PCR est utilisée pour la détection et l'isolement de gènes exprimés différemment. Cette technique est souvent préférée à l'hybridation soustractive, bien que ces deux méthodologies présentent la même finalité (Reuber et Ausubel, 1995). Le DDRT-PCR a pour avantages principaux une mise en oeuvre plus simple et l'utilisation d'une quantité d'ARN moins importante. La mise au point de cette technique analytique par Liang et Pardee en 1992 a contribué à l'avancée des

connaissances en biologie moléculaire animale (Biofutur, Ferrandis et Tessier-Viennois, 1996). Elle est également utilisée chez les végétaux, et s'avère adaptée à la recherche de marqueurs de la différenciation cellulaire (Torelli et al., 1996). Toutefois, des travaux plus récents insistent sur les limitations de cette technique.

2.1. Mise au point de la technique de DDRT-PCR.

L'adaptation du principe du DDRT-PCR à un processus biologique évolutif nécessite quelques précautions concernant la méthodologie et le choix des divers paramètres déterminant le bon déroulement de la réaction.

Nous avons choisi d'utiliser des ARNm purifiés plutôt que des ARN totaux comme matériel initiateur. *In vivo*, les ARNm ne représentent que 2 à 5 % des ARN totaux, qui comportent majoritairement des ARN ribosomiaux. De plus, dans ces 2 à 5 %, de nombreux ARNm sont présents à un très faible nombre de copies. L'utilisation d'ARNm permet de pallier en partie à ce problème, en augmentant la représentativité des ARNm "rares". Ce prérequis limite le problème de sensibilité imputé à cette technique et récemment mis en cause (Bertioli et al., 1995 ; Ledakis et al., 1998).

Le choix de la température de fixation des amorces au cours des cycles successifs de PCR détermine souvent la complexité et la lisibilité des profils obtenus. Une température trop faible favorise la fixation aspécifique des amorces, ce qui modifie la reproductibilité des profils obtenus en amplifiant le nombre de bandes contaminantes. Nous avons choisi une température de 42°C, qui donne des profils exploitables. Des études récentes montrent que cette température est adéquate pour les amorces que nous avons utilisées (Malhotra et al., 1998).

Différentes dilutions des produits de DDRT-PCR ont été testées, pour déterminer celle qui permettait d'obtenir des résultats en PCR quel que soit le couple d'amorces utilisé. Lorsqu'on utilise 0,5 µg d'ARNm polyadénylés pour la transcription inverse différentielle, la dilution au 1/50ème des produits de DDRT est la plus favorable pour produire en PCR des profils lisibles et reproductibles.

Après avoir déterminé les concentrations optimales des différents éléments utilisés pour la PCR, nous avons standardisé les réactions, et vérifié leur reproductibilité en réalisant les mêmes expériences de DDRT-PCR à partir de 3 lots d'ARNm polyA+ provenant de 3 cinétiques différentes.

Pour l'ensemble des expériences de mise au point de DDRT-PCR, les produits obtenus étaient séparés sur gel d'agarose. Nous avons réalisé des essais de séparation en gel d'acrylamide non dénaturant, suivis d'une révélation argentique. Comme He et al. (1994) l'ont rapporté, ce type de gel permet de révéler des profils plus complets, dans la

mesure où certains ADNc peu représentés apparaissent alors qu'ils n'étaient jamais visualisés en gel d'agarose. Nous avons donc choisi de séparer les produits de DDRT-PCR obtenus à partir des 20 amorces du kit Opéron B sur ce type de gel.

2.2. Identification de gènes exprimés différemment.

Par la technique de DDRT-PCR, nous avons mis en évidence une accumulation différentielle d'ARNm au cours de l'embryogenèse somatique chez la chicorée. Nous disposons de 20 profils, chacun provenant d'une réaction combinant une des 20 amorces aléatoires et l'amorce T12GC. Hormis le profil B3/T12GC, les 19 autres présentent une accumulation différente de produits au cours de l'embryogenèse somatique. Tous ces produits ne pouvant être étudiés en détail, nous avons choisi 2 ADNc dont la synthèse augmente au cours de la phase d'induction.

Le produit B1.5 s'accumule particulièrement à partir du J5, le produit B5.3 est plus abondamment représenté à partir du J3. Toutefois, les vérifications ultérieures, réalisées par hybridation du produit sélectionné avec l'ensemble des produits de DDRT-PCR dont il provient, montrent que des "faux positifs" peuvent être sélectionnés. En effet, le produit B1.5, sélectionné pour son accumulation à partir du J5, correspond en fait à un produit dont la synthèse est amplifiée à partir du J1 de la culture, et varie peu au cours de la cinétique. L'absence du produit B1.5 chez la chicorée Pévèle peut être due à des différences dans la séquence dans les zones où les amorces ont été déterminées.

Par contre, le produit B5.3 correspond bien au produit sélectionné pour son accumulation à partir du J3.

Nous avons donc poursuivi l'étude du produit B5.3 et du "faux" B1.5, puisque ce dernier présente toutefois l'intérêt d'être synthétisé plus abondamment à partir de la mise en culture. L'étape de contrôle de l'expression différentielle des produits sélectionnés est donc indispensable (Martin-Laurent et al., 1995).

Bien qu'elles soient visualisées lors d'une culture en conditions d'embryogenèse, ces modifications peuvent être liées à d'autres événements indépendants de ce processus morphogène. Chez *Arabidopsis* par exemple, des gènes liés à la sénescence sont induits après une incubation des feuilles pendant deux jours à l'obscurité (Park et al., 1998). Or chez la chicorée, la culture embryogène est réalisée à l'obscurité. Pour vérifier le degré d'implication des ADNc sélectionnés dans l'embryogenèse somatique, nous avons étudié en parallèle leur expression chez une chicorée qui ne produit pas d'embryons dans les conditions de culture établies. La chicorée Pévèle choisie répond cependant au traitement appliqué par la formation tardive de cal, où se développent des nodules visibles au 12^{ème} jour de culture (J5+7), incapables de s'enraciner après transfert sur milieu solide (Blanckaert, communication personnelle). Les deux plantes étant cultivées dans les

mêmes conditions, cette comparaison nous a permis de distinguer les gènes dont l'expression est liée aux conditions de culture de ceux impliqués dans l'embryogenèse somatique.

L'ADNc nommé B5.3 est homologue à près de 70% à des ESTs de riz et d'*Arabidopsis thaliana*. Les ESTs (Expressed Sequence Tags) représentent des séquences partielles d'ADNc. Ces derniers sont sélectionnés arbitrairement au sein d'une ou de plusieurs banques, réalisées à partir d'ARNm provenant de différents tissus d'une même plante soumis à des conditions de culture particulières, ce qui permet d'obtenir la représentation d'un large éventail d'ARNm. Chez le riz et *Arabidopsis thaliana*, moins de 40% des ESTs codent pour des protéines connues (revue par Dean et Schmidt, 1995). Chez la chicorée, la séquence B5.3 obtenue correspond à des ESTs qui n'ont pas été caractérisés. Chez le riz, un ADNc nommé REC1 a été isolé par DDRT-PCR. Il s'accumule de façon spécifique dans les cals embryogènes. Toutefois, sa séquence ne présente pas d'homologies avec celles identifiées et répertoriées dans les banques de données du NCBI (Jung et al., 1998).

Nous avons tenté de confirmer l'accumulation différentielle de l'ARNm correspondant à la séquence B5.3 par northern blot. Aucun signal n'a été obtenu au cours de la cinétique d'embryogenèse somatique, suggérant l'existence d'un nombre restreint de copies de cet ARNm. On peut supposer que la synthèse de cet ARN est corrélée à la présence de cellules qui s'engagent dans la voie embryogène. Or en moyenne, seules 4% des cellules du mésophylle sont concernées. Sa faible représentation au sein des ARN totaux serait donc liée au faible nombre de cellules qui le synthétisent. Chez la carotte, la transcription du gène SERK (codant pour un récepteur-kinase) au cours de l'embryogenèse n'est pas visualisée par northern blot (Schmidt et al., 1997). Une faible représentation peut être due à un taux de transcription du gène correspondant situé en dessous du seuil de détection du northern, ou à une dégradation rapide des transcrits (Luce et Burrows, 1998). L'utilisation d'ARNm polyadénylés pour la réalisation des northern permet d'augmenter la représentation de l'ARNm ciblé, jusqu'à ce qu'il soit visualisé. Chez la chicorée "474", un gène codant pour une Glutathion-S-Transférase s'exprime différemment au cours de la cinétique d'embryogenèse. Détecté par DDRT-PCR, la confirmation de sa transcription différentielle par northern blot nécessite l'utilisation d'ARNm polyadénylés (Galland, communication personnelle).

Le criblage d'une banque d'ADNc réalisée à partir d'ARNm de feuilles au J3 de la cinétique n'a pas permis de sélectionner l'ADNc complet. Nous avons alors tenté d'obtenir la séquence complète de l'ADNc correspondant au fragment B5.3 par RACE-

PCR. Cette technique nécessite l'utilisation d'une amorce spécifique du gène recherché, représentant souvent une séquence consensus retrouvée chez diverses espèces.

Pour un EST, le choix d'une amorce qui lui soit strictement spécifique n'est pas évident. Avec l'amorce que nous avons utilisé, nous avons obtenu une traînée dont certaines bandes se détachent, mais l'expérience n'est pas reproductible. Pour poursuivre cette étude, il serait nécessaire de tenter des expériences de NESTED-PCR, qui nous permettraient d'isoler cet EST. L'hybridation des produits de DDRT-PCR avec B5.3 montre une synthèse accrue de l'ARNm correspondant au cours de l'embryogenèse somatique. Cette augmentation est visualisée dès les premières étapes de la phase d'induction, suggérant une relation avec l'acquisition de la compétence embryogène, même si elle se poursuit durant la phase d'expression.

En effet, les coupes cytologiques réalisées montrent que les premières modifications cellulaires se produisent entre les 3^{ème} et 4^{ème} jours d'induction. Le milieu d'induction contient du glycérol, qui permet de synchroniser de façon relative le processus, en retardant la 1^{ère} division jusqu'au 4^{ème} jour, ce qui se traduit par l'observation au 4^{ème} jour de cellules embryogènes et de pro-embryons. D'autres cellules sont à leur tour réactivées et subissent une évolution identique. Au 5^{ème} jour, les fragments foliaires sont transférés dans un milieu dépourvu de glycérol, ce qui permet des divisions plus actives, et la formation des embryons somatiques. Toutefois, de nouvelles cellules sont réactivées et commencent à se diviser alors que des embryons sont en cours de développement.

La synthèse de l'ARNm correspondant à la séquence B5.3 pourrait donc être reliée à l'acquisition de la compétence embryogène, qui concerne différentes cellules tout au long de la cinétique.

Le second ADNc, nommé B1.5, correspond à un ARNm présentant des homologies importantes avec des ADNc codant pour des protéines de liaison au GTP.

La superfamille des protéines de liaison au GTP, encore appelées GTPases, regroupe les protéines qui peuvent se lier et hydrolyser le GTP. Elles interviennent dans la régulation de diverses réponses cellulaires. Cette superfamille comporte deux types de protéines, des protéines G hétérotrimériques et des petites protéines monomériques.

Les protéines G hétérotrimériques amplifient certains signaux dans les mécanismes de transduction. Les petites protéines de liaison au GTP, d'un poids moléculaire compris entre 20 et 30 kDa sont classées dans différentes sous-familles suivant la fonction qui leur est attribuée (Verma et al., 1994) :

- Discussion -

- Les protéines Ras ou Ras-like, impliquées dans les cascades qui transmettent des signaux extérieurs, dans la régulation de la croissance et la différenciation.
- Les protéines Rho et Rac intervenant dans l'adhésion cellulaire et l'organisation du cytosquelette.
- Les protéines Rab et Ypt, qui régulent le transport de vésicules et la biogenèse de la membrane.
- Les protéines Arf et Sar, impliquées dans la biogenèse de la membrane.
- Les protéines Ran et TC4, qui interviennent dans la synthèse de l'ADN et l'importation de protéines dans le noyau.

La plupart des informations concernant les petites protéines de liaison au GTP ont été obtenues chez les levures et les mammifères. Elles présentent de très fortes homologies de séquence et de structure entre elles, et les gènes correspondants sont très conservés. Chez les végétaux, plus de 40 protéines de liaison au GTP ont été identifiées et les gènes correspondants ont été clonés (Redhead et Palme, 1996). La sous-famille ras n'est pas représentée chez les végétaux ; les gènes codant pour ce type de protéines sont probablement très différents de leurs homologues du règne animal. La plupart des protéines de faible poids moléculaire sont reliées à la sous-famille rab des mammifères ou Ypt des levures, impliquées dans la régulation du transport vésiculaire intracellulaire.

Chez la chicorée "474", nous avons mis en évidence au moins deux ARNm codant pour des protéines qui présentent une homologie importante avec des protéines de liaison au GTP de type rab5.

La figure 40 (Olkkonen et Stenmark, 1997) schématise les différents compartiments cellulaires engagés dans ce transport vésiculaire. Le cheminement des molécules endo ou exocytées est décrit succinctement dans la légende du schéma.

- Discussion -

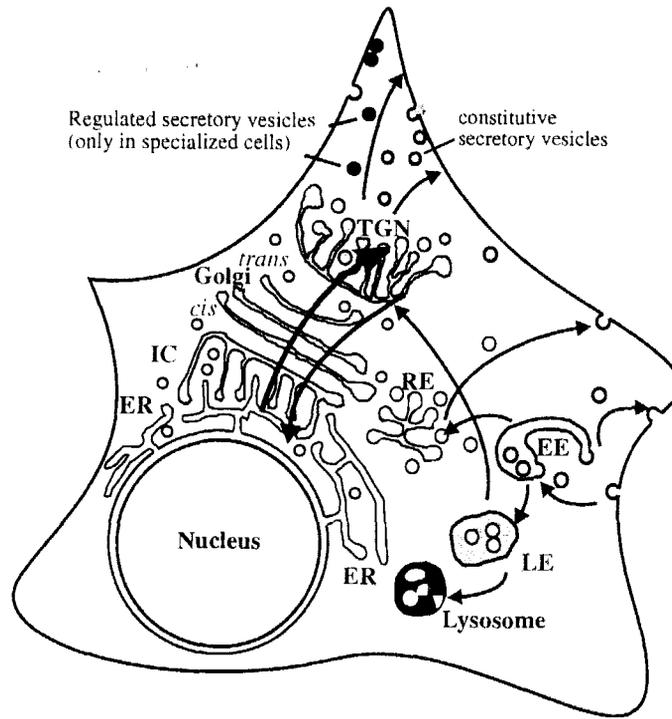


Figure 40 : Représentation schématique des voies de transport intracellulaire vésiculaire dans une cellule eucaryote (d'après Olkkonen et Stenmark, 1997).

Dans le cas d'une exocytose, les protéines membranaires et les protéines excrétées sont synthétisées dans le réticulum endoplasmique (ER), puis transportées vers le compartiment intermédiaire (IC) où sont sélectionnées les protéines devant être exportées vers l'appareil de Golgi. Dans ce dernier, les protéines sont maturées et exportées via la face trans (TGN).

Dans le cas d'une endocytose de composés provenant du milieu extérieur, des vésicules se forment au niveau de la membrane plasmique. Elles fusionnent pour former des endosomes précoces (EE). Les récepteurs membranaires peuvent être aussitôt recyclés, ou transiter par les endosomes de recyclage. Les endosomes précoces peuvent fusionner et former des endosomes tardifs (LE). Le transit se poursuit vers le lysosome, ou vers le TGN. Dans le lysosome, le matériel endocyté est digéré et peut être utilisé par la cellule. Dans le TGN, le matériel endocyté est réorienté vers la membrane plasmique via des vésicules exocytaires, ou vers le ER via l'appareil de Golgi (voie rétrograde du transport vésiculaire).

Chacune des protéines de type rab est associée à une étape particulière (figure 41) ; elles sont donc colocalisées de façon spécifique avec un ou plusieurs de ces compartiments cellulaires (Martinez et Goud, 1997).

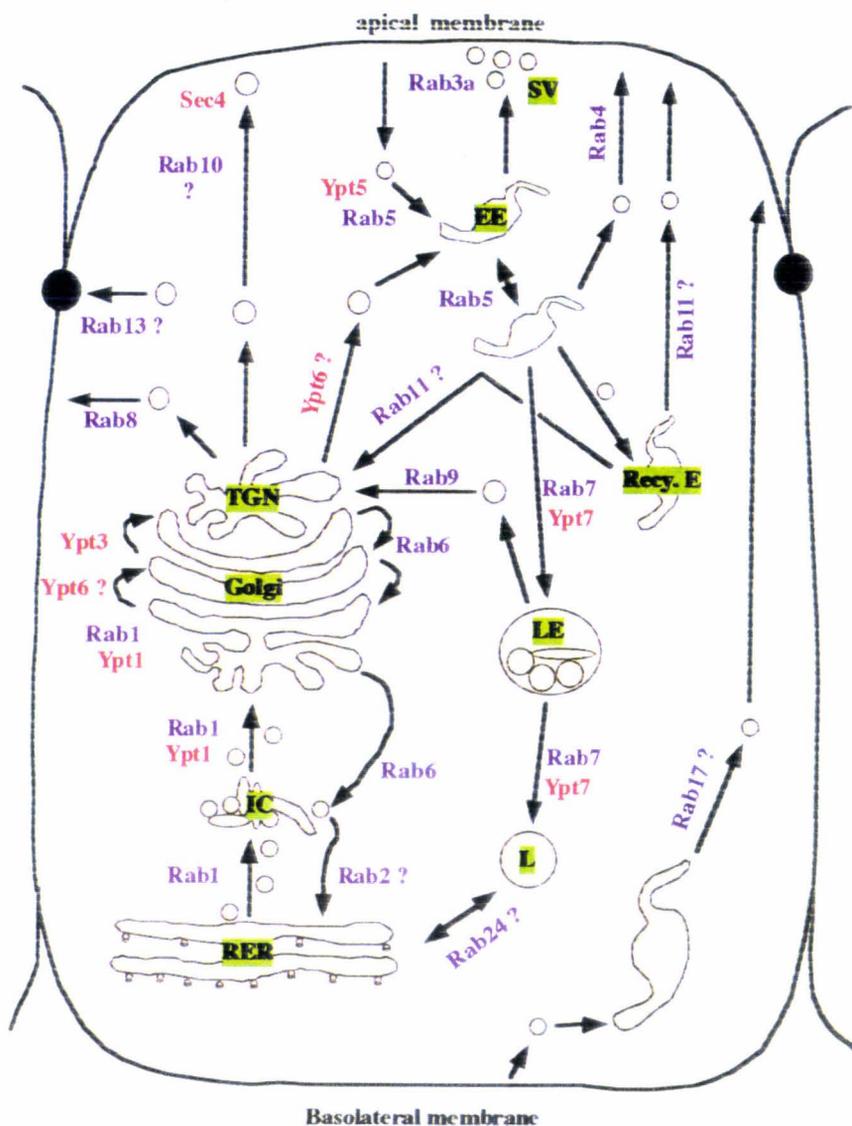


Figure 41 : représentation schématique de la localisation et de la fonction des protéines rab (mammifères) et Ypt (levures) dans une cellule eucaryote (d'après Martinez et Goud, 1998). RER : réticulum endoplasmique granuleux ; IC : compartiment intermédiaire ; TGN : réseau trans-Golgi ; SV : vésicule synaptique ; EE : endosome précoce ; LE : endosome tardif ; L : lysosome ; RecyE : endosomes de recyclage.

Chez les mammifères, il existe trois isoformes de la protéine rab5. Toutes trois sont ubiquistes, puisque leur expression est détectée dans différents types de tissus. Au niveau cellulaire, elles sont localisées sur la face cytoplasmique de la membrane plasmique et des endosomes précoces, ce qui leur confère une fonction dans le transport entre la membrane et les endosomes précoces, et la fusion de ces endosomes (revu par Olkkonen et Stenmark, 1997). Ces 3 isoformes, nommées rab5A, B et C, coopèrent pour réguler l'endocytose dans les cellules eucaryotes (Bucci et al., 1995). D'un point de vue fonctionnel, les protéines rab accomplissent un cycle entre une membrane donneuse et une membrane acceptrice, évoluant d'une forme inactive lorsqu'elles sont liées au GDP à une forme active lorsqu'elles sont liées au GTP.

La figure 42 (Lazar et al., 1997) présente leurs modalités de fonctionnement, et les différentes protéines qui interagissent avec ces GTPases pour que le transport vésiculaire soit effectif. Ces dernières sont responsables de l'activation ou de l'inactivation du transport, en régulant le passage de la GTPase de sa forme active à sa forme inactive et vice versa (Novick et Brennwald, 1993).

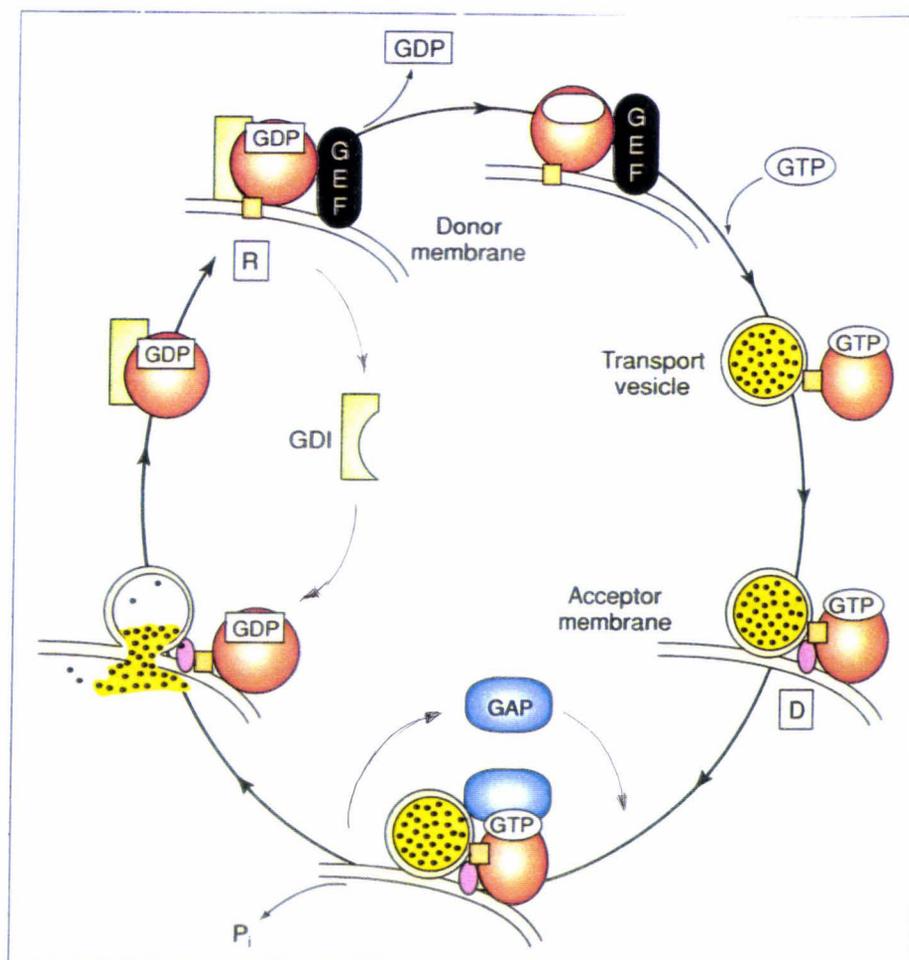


Figure 42 : cycle des GTPases au cours du transport vésiculaire chez les levures (d'après Lazar et al., 1997).

Après fusion de la vésicule avec la membrane acceptrice, un inhibiteur de la dissociation du GDP (GDI) libère la GTPase (liée au GDP) de la membrane, qui est alors guidée vers le compartiment donneur. Un récepteur (R) est supposé responsable de la liaison spécifique de la GTPase à la membrane. Lors de cette liaison, un facteur d'échange de la guanine (GEF) catalyse l'échange GDP/GTP. Après la formation de la vésicule et sa migration jusqu'à la membrane acceptrice, une protéine d'arrimage (D) est supposée permettre sa liaison à la membrane. Le GTP est hydrolysé grâce à l'intervention d'une protéine d'activation de la fonction GTPasique (GAP). La GTPase est alors libérée et disponible pour un nouveau cycle.

Chez les végétaux, des protéines rab5 ont été identifiées chez diverses espèces, mais la plupart des informations relatives à leur fonction potentielle sont déduites des observations effectuées chez les mammifères (Anuntalabhochai et al., 1991 ; Terryn et al., 1992). Les ARNm correspondants sont souvent présents dans divers organes d'une

même plante, mais les quantités détectées varient fortement d'un organe à l'autre. Chez *Vicia faba*, le gène *rab5* semble ne pas être transcrit dans les tissus foliaires (Saalbach et al., 1995). De même chez *Nicotiana tabacum*, l'ARNm *Nt-rab5* n'est pas détecté dans les feuilles par northern blot à partir d'ARN totaux, alors qu'il est très représenté dans les organes reproducteurs et les pétales. Toutefois, sa transcription dans les tissus foliaires est visualisée lorsque les auteurs utilisent des ARNm purifiés comme support d'hybridation. Ceci suggère une faible représentation de cet ARNm au sein de l'ensemble des transcrits, et donc potentiellement un taux de transcription réduit (Dallman et al., 1992). Chez la chicorée, nous avons constaté également la faible représentation d'un ARN homologue à un ARN *rab5* dans les tissus foliaires des vitroplants (J0). La culture en conditions d'embryogenèse déclenche la synthèse d'un second ARN du même type, comportant une centaine de bases supplémentaires, ce que nous visualisons par les résultats de RACE-PCR.

Chez la chicorée "474", les séquences codantes de GTP1 et GTP2, obtenues après DDRT-PCR en 3' et RACE en 5', diffèrent par 10 nucléotides. Parmi ces 10 différences observées, 7 semblent correspondre à des mutations silencieuses puisqu'elles n'influent pas sur la composition en acides aminés déduite. Les 3 autres se traduisent par la conversion de 3 acides aminés. Cette hétérogénéité est localisée dans des zones qui ne sont pas conservées chez les protéines *rab5* de différentes espèces. Deux hypothèses sont alors envisageables : soit les différences observées sont dues à des erreurs de PCR, les 2 séquences seraient donc en fait identiques et correspondraient à une seule protéine *rab5*, soit les différences observées traduisent l'expression de deux gènes différents. Parallèlement, GTP1 comporte 115 nucléotides de plus que GTP2 dans la région non traduite en 5' (5'UTR). Cette région est souvent impliquée dans la régulation de la traduction (Kozak, 1992). Cette différence peut s'expliquer par l'existence de différents sites d'initiation de transcription par exemple, qui permettraient d'obtenir deux transcrits de tailles différentes à partir d'un même gène. Chez *Arabidopsis*, deux séquences "leader" de tailles différentes peuvent précéder une même séquence codant pour une β -tubuline (Marks et al., 1987). Deux sites distincts d'initiation de la transcription, déterminées par des éléments de régulation probablement différents, permettraient donc la synthèse de deux transcrits (Gallie, 1993). En général, de tels ARNm ne sont pas transcrits simultanément ; la transcription préférentielle de l'un des ARNm est dépendante du type cellulaire considéré. L'existence d'une expression "tissu-dépendante" de certains gènes chez les végétaux a été prouvée par Racusen et Schiavone (1996).

Mais cette différence dans la région 5' non codante peut aussi être due à l'existence de deux gènes distincts (voire même deux gènes allèles) qui seraient à l'origine de GTP1 et GTP2.

Les expériences d'amplification de l'ADN génomique de la chicorée "474" par PCR montrent qu'il existe au moins 3 séquences génomiques distinctes qui présentent de fortes homologies avec la protéine rab5. L'une de ces séquences partielles génomiques, que nous avons nommée GGTP8, est très proche de GTP2, alors qu'une autre de ces séquences, nommée GGTP9, est plus proche de GTP1. Ces résultats suggèrent que les ADNc GTP1 et GTP2 représentent des ARNm qui proviennent de deux séquences génomiques distinctes. Elles peuvent correspondre à deux gènes allèles, puisque la chicorée "474" est un hybride.

Chez les végétaux, les protéines de type rab5 sont supposées impliquées dans les phénomènes de transport vésiculaire, par analogie avec les observations faites dans le règne animal.

Chez *Nicotiana plumbaginifolia*, deux ARNm de 1 kb et de 1,4 kb respectivement hybrident avec la sonde rhl1 correspondant à une protéine rab5. Ils sont plus abondamment transcrits dans les racines et dans les fleurs que dans les tiges et les feuilles. Les auteurs émettent l'hypothèse qu'une transcription plus importante serait liée aux besoins de certaines cellules spécialement impliquées dans les processus d'endocytose (Terry et al., 1992). Chez la chicorée, l'accumulation de GTP2 est maintenue chez la variété embryogène tout au long de la cinétique, alors qu'elle cesse chez la variété non embryogène à partir du 4^{ème} jour de culture. Le maintien de la synthèse de l'ARN GTP2 chez la chicorée "474" pourrait donc être dû à la présence des cellules embryogènes à partir du 4^{ème} jour, animées d'un transport vésiculaire plus important.

Chez *Lotus japonicus*, l'expression de gènes codant pour des protéines rab5 a été étudiée dans des nodules racinaires après infection par une souche de *Rhizobium*. Deux gènes codant pour deux protéines de type rab5 ont été mis en évidence, nommés respectivement Lj-rab5A et Lj-rab5B. Le gène Lj-rab5B est exprimé de façon identique dans les nodules immatures et matures, mais aussi dans les feuilles de jeunes plantes. Son expression serait donc constitutive, et ne serait pas liée à l'infection ni à la différenciation cellulaire qui s'en suit. A l'inverse, la quantité de l'ARNm Lj-rab5A augmente au cours du développement nodulaire, lui conférant probablement une fonction dans un processus endocytique lié au développement nodulaire (Borg et al., 1997). Chez la chicorée "474", l'homologie la plus importante est obtenue avec Lj-rab5A. Comme chez *Lotus japonicus*, l'ARNm GTP2 existe déjà dans les feuilles de plantules non induites ; mais sa représentation n'augmente pas au cours de la cinétique. Toutefois, elle n'est plus visualisée après le 4^{ème} jour de la cinétique chez la chicorée Pévèle non embryogène. Ceci suggère que son maintien chez la chicorée embryogène est lié à la reprise des divisions cellulaires orientées vers la formation des embryons.

Au niveau génique, cette différence d'expression peut s'expliquer par une régulation distincte de la transcription de ce gène chez les deux variétés de chicorée. Chez la chicorée Pévèle, la transcription du gène correspondant à GTP2 serait réprimée à partir du J4. Ces mécanismes régulateurs, aboutissant à la répression de l'expression d'un gène, se manifestent par blocage de la transmission du signal de transcription ou inhibition de l'activation par des facteurs agissant en "trans" (Renkawitz, 1990).

L'ARNm GTP1 est quant à lui transcrit à partir du 1^{er} jour de culture chez les 2 chicorées. Sa présence serait donc liée à la mise en culture, et pourrait être considérée comme une réponse adaptative au stress subi par les explants foliaires, puisqu'elle persiste tout au long de la culture. Toutefois, la culture en conditions embryogènes différant fortement des conditions initiales de culture des plantules, il est difficile de relier directement la transcription de GTP1 à l'un des facteurs environnementaux appliqués. Chez *Arabidopsis thaliana*, la protéine rab5, nommée rha1, a été largement étudiée. Des plants d'*Arabidopsis thaliana* ont été transformés par une construction chimérique comportant le promoteur de rha1, suivi de la région codante du gène *gus*. Dans la descendance, l'expression du gène *gus* est principalement localisée dans les cellules de garde des stomates. Pour déterminer quels facteurs étaient susceptibles d'influencer l'expression de *gus* couplé au promoteur rha1, divers traitements ont été infligés aux plantules. Un maintien à l'obscurité, une augmentation de l'humidité ambiante ou une incubation des plantules à 4° ou à 37°C n'altèrent pas l'expression du gène sous contrôle du promoteur rha1. Après un traitement hormonal à l'AIA ou l'ABA, seules les cellules de garde des extrémités racinaires présentent une augmentation dans l'expression du gène *gus* (Terry et al., 1993). Dans notre système, les conditions de cultures appliquées regroupent ces divers éléments (température de 35°C, culture en milieu liquide et à l'obscurité, addition de régulateurs de croissance au milieu de culture). Ils semblent déclencher la transcription de GTP1 chez la chicorée. Chez *Arabidopsis*, les différents traitements ont été appliqués indépendamment les uns des autres, alors que les conditions d'embryogenèse chez la chicorée cumulent ces facteurs environnementaux. Comme chez d'autres espèces, l'embryogenèse somatique chez la chicorée est la résultante de l'application de divers éléments tous indispensables. La transcription de GTP1 pourrait donc également dépendre de la présence concomitante de ces divers éléments.

Si l'on considère un système où la séquence codant pour la protéine rab5 pourrait provenir de deux séquences génomiques comportant deux régions promotrices différentes, deux ARNm différents en 5' pourraient être transcrits différemment. L'une des régions promotrices serait sous le contrôle d'éléments effecteurs mobilisés en conditions de stress, ce qui déclencherait la transcription de GTP1 ; l'autre serait activée de façon ponctuelle dans des cellules concernées par un transport vésiculaire actif, en

l'occurrence les cellules embryogènes, où l'ARNm GTP2 serait transcrit. Maniatis et al. (1987) ont ainsi établi deux modèles de régulation pouvant expliquer ce phénomène :

- des facteurs agissant en trans seraient différents suivant les tissus concernés et contrôleraient positivement ou négativement l'activation du gène considéré. Ils agiraient sur un même élément cible situé en cis (nommé encore enhancer) ou sur des éléments cibles différents suivant le type cellulaire qui est en cause.

- des facteurs trans communs seraient présents dans tous les types cellulaires. Ils agiraient sur un élément cible unique mais spécifique du type cellulaire considéré.

Si les ARNm rab5 sont traduits et si la protéine obtenue subit les modifications post-traductionnelles qui lui confèrent sa fonctionnalité, alors la mise en place d'une embryogenèse somatique s'accompagne d'une synthèse plus importante de la protéine rab5.

L'existence d'une conservation importante des séquences des gènes rab5 entre le règne animal et le règne végétal a permis de formuler certaines hypothèses concernant les fonctions possibles de ces petites protéines chez les végétaux (Terry et al., 1993). C'est par analogie avec le règne animal que leur rôle dans le transport vésiculaire chez les végétaux a été établi. Dans le règne animal, rab5 a été localisée au niveau de la voie endocytaire du transport intracellulaire (Bucci et al., 1992). Chez la chicorée, nous ne pouvons qu'émettre quelques hypothèses quant au rôle direct de cette protéine rab5 dans l'embryogenèse somatique. Chez le blé, une petite protéine de liaison au GTP de 20 kDa a été mise en évidence dans le cytoplasme d'embryons zygotiques mis en germination depuis 40 heures. Elle n'est pas détectée dans la fraction protéique pariétale, alors que la plupart des GTPases sont associées à la paroi (Sacchi et al., 1996). L'approche biochimique réalisée et les résultats présentés ne permettent pas de déterminer la famille d'appartenance de cette protéine, ni de statuer sur son rôle potentiel dans le développement des embryons. Chez *Lotus japonicus*, la représentation de l'ARNm Lj-rab5A augmente au cours du processus de différenciation qu'est le développement nodulaire après infection par *Rhizobium* (Borg et al., 1997). Le maintien de la synthèse de l'ARN GTP2 chez la chicorée embryogène lors de la reprise des divisions cellulaires orientées vers l'embryogenèse pourrait donc refléter son implication dans ce phénomène de morphogenèse.

Durant l'embryogenèse somatique, des échanges se créent entre les cellules et le milieu extérieur ; des protéines sont excrétées et des molécules contenues dans le milieu de culture sont endocytées. Mais ces processus peuvent être plus complexes. Chez la carotte, des expériences d'hybridation *in situ* ont permis de localiser la transcription des gènes codant pour une endochitinase EP3. Comme nous l'avons vu dans la partie bibliographique, l'ajout de cette protéine extracellulaire au milieu de culture permet le

développement des embryons chez un mutant thermosensible. Or les gènes correspondants ne sont pas exprimés dans les embryons somatiques, mais dans d'autres cellules de la suspension (van Hengel et al., 1997). Les cellules synthétisant EP3 auraient donc un rôle dans la coordination de l'embryogenèse somatique, ce qui montre l'existence d'une communication intercellulaire au cours de l'embryogenèse somatique. Les processus de transmission de signaux et de transport semblent donc jouer un rôle important durant l'embryogenèse somatique.

CINQUIEME PARTIE

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les travaux rapportés dans ce mémoire concernent la compréhension du déterminisme de l'embryogenèse somatique chez un hybride de chicorée, en s'attachant à mieux caractériser les modifications intervenant précocement dans l'expression des gènes.

L'analyse des protéines synthétisées *de novo* et les résultats des expériences de traduction *in vitro* ont montré que de nombreux gènes subissaient des modifications transcriptionnelles et post-transcriptionnelles lors de l'embryogenèse somatique. Ces modifications peuvent intervenir dès la mise en culture des fragments foliaires, ce qui leur confère probablement un rôle dans l'adaptation des tissus au nouvel environnement auquel ils sont soumis. D'autres se produisent plus précisément au cours de l'induction de l'embryogenèse ou du développement des embryons somatiques. Contrairement aux observations effectuées chez d'autres espèces embryogènes, des remaniements importants affectent l'expression des gènes au cours de l'embryogenèse somatique chez la chicorée "474". L'originalité de ce travail réside dans l'abondance des modifications relevées, dans un système d'embryogenèse directe.

Pour caractériser certains gènes affectés dans leur transcription au cours du processus, nous avons utilisé la technique de DDRT-PCR. La performance de cette technique est liée à la mise en place d'une stratégie expérimentale adaptée et à une vérification des résultats obtenus. Nous avons ainsi isolé deux ADNc partiels présentant une accumulation différentielle au cours de la cinétique d'embryogenèse étudiée. L'un d'entre eux n'est toujours pas caractérisé; il présente une forte homologie avec des ESTs. Le second correspond à la partie 3' d'une séquence codant pour une petite protéine de liaison au GTP de type rab5. Des expériences de RACE-PCR ont permis la mise en évidence de l'existence de quatre séquences 5' correspondantes; deux ont été clonées et séquencées. Le criblage d'une banque d'ADNc de chicorée, réalisée au 3^{ème} jour de culture, a montré l'existence de deux ADNc qui diffèrent particulièrement dans leurs extrémités 5' et 3' non codantes, qui diffèrent également des produits de RACE-PCR séquencés, tout en codant tous pour la même protéine rab5. Ces résultats montrent l'abondance de transcrits de séquence différente codant cependant pour la même protéine. Cette hétérogénéité peut être liée à une synthèse différentielle suivant le type cellulaire considéré. L'un des ADNc, nommé GTP1, est synthétisé chez la chicorée "474" embryogène et chez une espèce non embryogène après un jour de culture en conditions d'embryogenèse. Sa présence serait donc induite par les nouvelles conditions de culture appliquées, et ne serait pas directement impliquée dans l'embryogenèse somatique. Un autre ADNc, GTP2, présente une accumulation différente. Présent dans les feuilles des

plantules des variétés embryogène et non embryogène, sa synthèse disparaît après 4 jours de culture chez la chicorée non embryogène, alors qu'elle est maintenue chez la chicorée embryogène. Nous supposons donc la nécessité de sa synthèse au cours de l'embryogenèse somatique. Le rôle des petites GTPases de type rab5 n'est pas défini précisément chez les végétaux. Toutefois, par analogie avec le règne animal, elles seraient impliquées dans les premières étapes de la voie endocytaire du transport vésiculaire intracellulaire. Les résultats que nous avons obtenus suggèrent donc une endocytose accrue lors de l'embryogenèse somatique.

Loin d'être due à un seul gène, l'embryogenèse somatique apparaît donc comme la résultante de modifications dans l'expression de nombreux gènes. Cette reprogrammation importante explique la difficulté qui réside dans la mise en évidence de marqueurs de l'embryogenèse somatique. Qu'elle dépende de la somme d'évènements indépendants déterminants ou d'une cascade d'évènements liés, l'acquisition de la compétence embryogène se présente comme une déviation conséquente du programme d'expression génique préétabli.

La même stratégie, combinant les techniques de DDRT-PCR et de RACE-PCR, devrait permettre l'identification d'autres gènes affectés dans leur expression au cours de l'embryogenèse somatique. Ainsi un autre ADNc, codant pour une Gluthation S-Tranferase (GST), a été récemment isolé chez la chicorée. L'expression du gène correspondant est détectée à partir du 3^{ème} jour de culture des fragments foliaires et s'amplifie au cours du déroulement de l'embryogenèse (Galland, communication personnelle). Chez le tabac, cette protéine serait impliquée dans l'initiation de l'activité méristématique de protoplastes provenant de cellules différenciées de mésophylle (Takahashi et Nagata, 1992).

Nous avons isolé un EST, qui semble s'accumuler au cours de la cinétique embryogène. Pour mieux le caractériser, nous pourrions tenter des expériences de NESTED-PCR. La partie 5' obtenue pourrait comporter des motifs consensus permettant de lui conférer une fonction particulière. Pour confirmer une responsabilité potentielle dans l'embryogenèse somatique, des expériences de transformation pourraient alors être envisagées.

Concernant les ADNc représentant des ARN homologues à des ARN codant pour des protéines rab5, nous avons émis quelques hypothèses quant à leur synthèse et leur implication dans l'embryogenèse somatique. Il faudrait donc tout d'abord vérifier que ces ARN codent bien pour des GTPases *in vivo*. Pour cela, l'ORF de l'ADNc GTP1 pourrait être transférée dans un vecteur d'expression, et la protéine recombinante obtenue serait

alors soumise à un test de liaison au GTP *in vitro*, comme l'ont réalisé Jako et Teyssendier de la Serve pour une petite protéine de type Rab1 (1996).

Une visualisation différentielle des ARNm GTP1 et GTP2 confirmerait l'hypothèse d'une synthèse différente de ces ARN suivant le type cellulaire considéré. Toutefois, le fait qu'ils sont très homologues dans leur région codante ne permettra pas de les visualiser de façon différentielle par des expériences d'hybridation *in situ* traditionnelles. Seule l'existence de 115 pb supplémentaires situées à l'extrémité 5' non codante de GTP1 devrait rendre possible la localisation spécifique de cet ARNm. Une étude des promoteurs semble plus appropriée. Pour cela, nous pourrions isoler les promoteurs par PCR inverse, puis leur associer un gène rapporteur. Les constructions obtenues serviraient à transformer des plantes de façon indépendante, pour ainsi visualiser l'expression du gène rapporteur, contrôlée par les promoteurs de GTP1 et GTP2. Nous pourrions ainsi localiser l'expression du gène codant pour l'ARNm GTP2, qui est temporellement associé à la reprise des divisions cellulaires. Par ailleurs, les racines des plantules de chicorée "474" sont elles aussi embryogènes, dans les mêmes conditions de culture. L'expression des gènes *rab5* en relation avec l'embryogenèse serait ainsi vérifiée, sachant que les ARNm *rab5* sont en général plus abondamment transcrits dans les racines que dans les feuilles.

L'abondance de séquences génomiques codant pour des protéines très proches d'un point de vue fonctionnel pourrait toutefois constituer un frein à l'avancée des connaissances. Chez *Arabidopsis*, une surexpression du gène *Ara4*, homologue au gène *rab11* des mammifères, n'induit pas de modifications phénotypiques visibles. Les auteurs suggèrent une autorégulation par le biais de modifications de l'expression d'autres gènes de ce type (Uchimiya et al., 1998).

L'existence de modifications dans la synthèse d'éléments impliqués dans le transport vésiculaire intracellulaire donne de nouvelles pistes de recherches. En effet, nous avons vu dans la partie bibliographique introduisant ce travail que des protéines étaient secrétées durant l'embryogenèse somatique, supposant un processus d'exocytose activé. Connaissant mieux les différents éléments impliqués dans le transport vésiculaire, nous pourrions cibler les gènes *rab* impliqués dans l'exocytose et analyser leur expression au cours de l'embryogenèse somatique. Les protéines de liaison au GTP de type *rab* pourraient agir comme éléments régulateurs des deux voies du transport vésiculaire (Thiel et Battey, 1998).

L'existence de modifications aussi subtiles dans les systèmes de transduction de signaux au cours de l'embryogenèse somatique reflète la complexité des mécanismes intervenant dans le déterminisme d'un tel processus morphogène.

- Conclusions et perspectives -

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

Altschul S. F., Madden T. L., Schäffer A. A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D. J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST : a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*, 25, 3389-3402.

Anuntalabhochai S., Terryn N., Van Montagu M., Inzé D., 1991. Molecular characterization of an *Arabidopsis thaliana* cDNA encoding a small GTP-binding protein, Rha1. *Plant J.*, 1 (2), 167-174.

Bassam B. J., Caetano-Anollés G., Gresshoff P. M., 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.*, 196, 80-83.

Bertioli D. J., Burrows P. R., 1995. A simple RACE method based on CTAB precipitation. *Meth. Mol. Cell. Biol.*, 5, 118-121.

Bertioli D. J., Schlichter U. H. A., Adams M. J., Burrows P. R., Steinbiß H-H., Antoniw J. F., 1995. An analysis of differential display shows a strong bias towards high copy number mRNAs. *Nucleic Acids Res.*, 23 (21), 4520-4523.

Blervacq A-S., Dubois T., Dubois J., Vasseur J., 1995. First divisions of somatic embryogenic cells in *Cichorium* hybrid "474". *Protoplasma*, 186, 163-168.

Borg S., Brandstrup B., Jensen T. J., Poulsen C., 1997. Identification of new protein species among 33 different small GTP-binding proteins encoded by cDNAs from *Lotus japonicus*, and expression of corresponding mRNAs in developing root nodules. *The Plant J.*, 11 (2), 237-250.

Borkird C., Choi J. H., Jin Z-H., Franz G., Hatzopoulos P., Chorneau R., Bonas U., Pelegri F., Sung Z. R., 1988. Developmental regulation of embryonic genes in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 6399-6403.

Boyer C., Hilbert J-L., Vasseur J., 1993. Embryogenesis-related proteins synthesis and accumulation during early acquisition of somatic embryogenesis competence in *Cichorium*. *Plant Sci.*, 93, 41-53.

- Bibliographie -

Boyer C., Hilbert J-L., Vasseur J., 1994. Two-dimensional gel electrophoretic analysis of the changes in protein patterns during early somatic embryogenesis in *Cichorium* root tissues. *Plant Physiol.*, 13, 183-189.

Breton C., 1993. Clonage et caractérisation de gènes exprimés durant l'embryogenèse zygotique précoce du maïs. Thèse de Biotechnologie Végétale, Lyon I, 200.93.

Bucci C., Lutcke A., Steele-Mortimer O., Olkkonen V. M., Dupree P., Chiariello M., Bruni C. B., Simons K., Zerial M., 1995. Co-operative regulation of endocytosis by three rab5 isoforms. *FEBS Lett.*, 366 (1), 65-71.

Capitanio G., Baldan B., Filippini F., Terzi M., Lo Schiavo F., Mariani P., 1997. Morphogenetic effects of Brefeldin A on embryogenic cell cultures of *Daucus carota* L.. *Planta*, 203, 121-128.

Chirgwin J. M., Przybyla A. E., MacDonald R. J. and Rutter W. J., 1979. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry*, 18, n°24 : 5294-5299.

Choi J. H., Liu L-S., Borkid C. and Sung Z. R., 1987. Cloning of genes developmentally regulated during plant embryogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 1906-1910.

Cordewener J., Booij H., van der Zandt H., van Engelen F., van Kammen A., de Vries S. C., 1991. Tunicamycin-inhibited carrot somatic embryogenesis can be restored by secreted cationic peroxidase isoenzymes. *Planta*, 184, 478-486.

Corpet F., 1988. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucl. Acids Res.*, 16 (22), 10881-10890.

Coutos-Thevenot P., Maes O., Jouenne T., Mauro M-C., Boulay M., Deloire A., Guern J., 1992. Extracellular protein patterns of grapevine cell suspensions in embryogenic and non embryogenic situations. *Plant Sci.*, 86, 137-145.

Coutos-Thevenot P., Jouenne T., Maes O., Guerbette F., Grosbois M., Le Caer J-P., Boulay M., Deloire A., Kader J-C., Guern J., 1993. Four 9-kDa proteins excreted by somatic embryos of grapevine are isoforms of lipid-transfer proteins. *Eur. J. Biochem.*, 217, 885-889.

- Bibliographie -

Dallman G., Sticher L., Marshallsay C., Nagy F., 1992. Molecular characterization of tobacco cDNAs encoding two small GTP-binding proteins. *Plant Mol. Biol.*, 19, 847-857.

Dean C., Schmidt R., 1995. Plant genomes : a current molecular description. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 46, 395-418.

Decout E., Dubois T., Guedira M., Dubois J., Audran J-C., Vasseur J., 1994. Role of temperature as a triggering signal for organogenesis or somatic embryogenesis in wounded leaves of chicory cultured *in vitro*. *J. Exp. Bot.*, 45 (281), 1859-1865.

Decout E., 1998. Recherche de marqueurs cytologiques et biochimiques de la différenciation embryogène et caulogène dans des feuilles d'une chicorée hybride. Thèse de Biologie et Physiologie Végétales, Reims.

De Jong A. J., Cordewener J., Lo Schiavo F., Terzi M., Vandekerckhove J., van Kammen A., de Vries S. C., 1992. A carrot somatic embryo mutant is rescued by chitinase. *Plant Cell*, 4, 425-433.

De Jong A. J., Hendriks T., Meijer E. A., Penning M., Lo Schiavo F., Terzi M., van Kammen A., de Vries S. C., 1995. Transient reduction in secreted 32 kD chitinase prevents somatic embryogenesis in the carrot (*Daucus carota* L.) variant *ts11*. *Dev. Gen.*, 16, 332-343.

De Vries S. C., Booij H., Meyerink P., Huisman G., Wilde H. D., Thomas T. L., van Kammen A., 1998. Acquisition of embryogenic potential in carrot cell-suspension cultures. *Planta*, 176 : 196-204.

De Vries S. C., Booij H., Janssens R., Vogels R., Saris L., Lo Schiavo F., Terzi M., van Kammen A., 1988. Carrot somatic embryogenesis depends on the phytohormone-controlled presence of correctly glycosylated extracellular proteins. *Genes Dev.*, 2 : 462-476.

Domon J-M., Meyer Y., Faye L., David A., David H., 1994. Extracellular (glyco)proteins in embryogenic and non-embryogenic cell lines of Caribbean pine. Comparaison between phenotypes of Stage one somatic embryos. *Plant Physiol. Biochem.*, 32 (1), 137-147.

- Bibliographie -

Domon J-M., Dumas B., Lainé E., Meyer Y., David A., David H., 1995. Three glycosylated polypeptides secreted by several embryogenic cell cultures of pine show highly specific serological affinity to antibodies directed against the wheat germin apoprotein monomer. *Plant Physiol.*, 108, 141-148.

♣. Dubois T., Dubois J. Guedira M., Vasseur J., 1988. Embryogenèse somatique directe sur les styles de *Cichorium* : effets de la température et origine des embryoides. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 307, série III, 669-675.

Dubois T., Guedira M., Dubois J., Vasseur J., 1990. Direct somatic embryogenesis in roots of *Cichorium*. Is callose an early marker ? *Ann. Bot.*, 65, 539-545.

Dubois T., Guedira M., Dubois J., Vasseur J., 1991. Direct somatic embryogenesis in leaves of *Cichorium*. A histological and SEM study of early stages. *Protoplasma*, 162, 120-127.

Dubois T., Dubois J., Guedira M., Diop A., Vasseur J., 1992. SEM characterization of an extracellular matrix around somatic pro-embryos in roots of *Cichorium*. *Ann. Bot.*, 70, 119-124.

Dudits D., Bögre L., Györgyey J., 1991. Molecular and cellular approaches to the analysis of plant embryo development from somatic cells *in vitro*. *J. Cell Sci.*, 99, 475-484.

Dudits D., Györgyey J., Bögre L., Bako L., 1991. Molecular biology of somatic embryogenesis. In : *In vitro* embryogenesis in plant, Thorpe T. A. Ed., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 267-307.

Egertsdotter U., Mo L. H., von Arnold S., 1993. Extracellular proteins in embryogenic suspension cultures of Norway spruce (*Picea abies*). *Physiol. Plant.*, 88, 315-321.

Emons A. M. C., 1994. Somatic embryogenesis : cell biological aspects. *Acta Bot. Neerl.*, 43 (1), 1-14.

Faure O. and Nougarede A., 1993. Nuclear DNA content of somatic and zygotic embryos of *Vitis vinifera* cv. Grenache noir at the torpedo stage. *Protoplasma*, 176 : 145-150.

Ferrandis E., Tessier-Viennois B., 1996. Un nouvel outil pour l'expression génique. *Biofutur*, 161, 33-35.

Gallie D. R., 1993. Posttranscriptional regulation of gene expression in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 44, 77-105.

Gavish H., Vardi A., Fluhr R., 1991. Extracellular proteins and early embryo development in *Citrus* nucellar cell cultures. *Physiol. Plant.*, 82, 606-616.

Gavish H., Vardi A., Fluhr R., 1992. Suppression of somatic embryogenesis in *Citrus* cell cultures by extracellular proteins. *Planta*, 186, 511-517.

Giroux R. W., Pauls K. P., 1996. Characterization of embryogenesis-related proteins in alfalfa (*Medicago sativa*). *Physiol. Plant.*, 96, 585-592.

Giroux R. W., Pauls K. P., 1997. Characterization of somatic embryogenesis-related cDNAs from alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Mol. Biol.*, 33, 393-404.

Green P. J., 1993. Control of mRNA stability in higher plants. *Plant Physiol.*, 102: 1065-1070.

Guedira M., Dubois-Tylski T., Vasseur J., Dubois J., 1989. Embryogenèse somatique directe à partir de cultures d'anthers du *Cichorium* (Asteraceae). *Can. J. Bot.*, 67, 970-976.

Györgyey J., Gartner A., Németh K., Magyar Z., Hirt H., Heberle-Bors E. and Dudits D., *Plant Mol. Biol.*, 16 : 999-1007.

Hahne G., Mayer J. E., Lorz H., 1988. Embryogenic and callus-specific proteins in somatic embryogenesis of the grass, *Dactylis glomerata* L.. *Plant Sci.*, 55, 267-279.

He G., Prakash C. S., Jarret R. L., Tuzun S., Qiu J., 1994. Comparison of gel matrices for resolving PCR-amplified DNA fingerprint profiles. *PCR Methods and Applications*, 4, 50-51.

Heberle-Bors E., De Vries S., 1997. Le développement embryonnaire des végétaux. *Biofutur*, 172, 38-42.

Heirwegh K. M. G., Banerjee N., Van Nerum K., de Langhe E., 1985. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Cichorium intybus* L. (Witloof, compositae). *Plant Cell Rep.*, 4, 108-111.

Helleboid S., Couillerot J-P., Hilbert J-L., Vasseur J., 1995. Inhibition of direct somatic embryogenesis by α -difluoromethylarginine in a *Cichorium* hybrid : effects on polyamine content and protein patterns. *Planta*, 196, 571-576.

Helleboid S., 1998. Caractérisation de protéines extracellulaires reliées aux phases précoces de l'embryogenèse somatique d'un *Cichorium* hybride. Analyses immunocytologique et moléculaire de l'implication de b-1,3-glucanases accumulées au cours du processus embryogène. Thèse GEBM, Compiègne, D1148.

Heller R., 1953. Recherches sur la nutrition minérale des tissus végétaux cultivés *in vitro*. *Ann. Sci. Nat. Bot. Biol. Veg.*, 14, 1-223.

Hendriks T., Scheer I., Quillet M-C., Randoux B., Delbreil B., Vasseur J., Hilbert J-L., 1998. A nonsymbiotic hemoglobin gene is expressed during somatic embryogenesis in *Cichorium*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1443, 193-197.

Hetherington P. R., Fry S. C., 1993. Xyloglucan endotransglycosylase activity in carrot cell suspensions during cell elongation and somatic embryogenesis. *Plant Physiol.*, 103, 987-992.

Hilbert J.-L., Dubois T., Vasseur J., 1992. Detection of embryogenesis-related proteins during somatic embryo formation in *Cichorium*. *Plant Physiol. Biochem.*, 30 (6), 733-741.

Hochstrasser D. F., Harrington M. G., Hochstrasser A. C., Miller M. J., Merrill C. R., 1988. Methods for increasing the resolution of two-dimensional protein electrophoresis. *Anal. Biochem.*, 173, 424-435.

Jako C., Teyssendier de la Serve B., 1996. Cloning and characterization of a cDNA encoding a Rab1-like small GTP-binding protein from *Petunia hybrida*. *Plant Mol. Biol.*, 31 : 923-926.

Jung B. K., Pyo J. H., Kim W. S., Nam B. H., Hwang S. J., Hwang B., 1998. Cloning of genes specifically expressed in rice embryogenic cells. *Mol. Cells*, 8 (1), 62-67.

Kapros T., Bögre L., Nemeth K., Bako L., Györgyey J., Wu S. C., Dudits D., 1992. Differential expression of histone H3 variants during cell cycle and somatic embryogenesis in alfalfa. *Plant Physiol.*, 98, 621-625.

Kawahara R., Sunabori S., Fukada H. and Komamine A., 1992. A gene expressed preferentially in the globular stage of somatic embryogenesis encodes elongation-factor 1a in carrot. *Eur. J. Biochem.*, 209 : 157-162.

Kiyosue T., Dong D. J., Satoh S., Kamada H., Harada H., 1990. Detection of an embryogenic cell antigen in carrot. *Plant Cell Physiol.*, 31, 947-950.

Kiyosue T., Takano K., Kamada H., Harada H., 1990. Induction of somatic embryogenesis in carrot by heavy metal ions. *Can. J. Bot.*, 68, 2301-2303.

Kiyosue T., Satoh S., Kamada H., Harada H., 1991. Purification and immunohistochemical detection of an embryogenic cell protein in carrot. *Plant Physiol.*, 95, 1077-1083.

Kiyosue T., Satoh S., Kamada H., Harada H., 1992. Immunological detection of an embryogenic-cell protein (ECP31) during stress-induced somatic embryogenesis in carrot. *Can. J. Bot.*, 70, 651-653.

Kiyosue T., Nakayama J., Satoh S., Isogai A., Suzuki A., Kamada H., Harada H., 1992. Partial amino-acid sequence of ECP31, a carrot embryogenic-cell protein, and enhancement of its accumulation by abscisic acid in somatic embryos. *Planta*, 186, 337-342.

Komamine A., Kawahara R., Matsumoto M., Sunabori S., Toya T., Fujiwara A., Tsukahara M., Smith J., Ito M., Fukuda H., Nomura K., Fujimura T., 1992. Mechanisms of somatic embryogenesis in cell cultures : physiology, biochemistry, and molecular biology. *In vitro Cell. Dev. Biol.*, 28P, 11-14.

Kozak M., 1992. Regulation of translation in eukaryotic systems. *Ann. Rev. Cell Biol.*, 8, 197-225.

Kragh K. M., Hendriks T., de Jong A. J., Lo Schiavo F., Bucherna N., Hojrup P., Mikkelsen J. D., de Vries S. C., 1996. Characterization of chitinases able to rescue somatic embryos of the temperature-sensitive carrot variant *ts11*. *Plant Mol. Biol.*, 31, 631-645.

- Bibliographie -

Krochko J. E., Pramanik S. K. and Bewley J. D., 1992. Contrasting storage protein synthesis and messenger RNA accumulation during development of zygotic and somatic embryos of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiol.*, 99 : 46-53.

Komamine A., Kawahara R., Matsumoto M., Sunabori S., Toya T., Fujiwara A., Tsukahara M., Smith J., Ito M., Fukada H., Nomura K. and Fujimura T., 1992. *In vitro* Cell. Dev. Biol., 28 P : 11-14.

Laemmli U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.

Lazar T., Götte M., Gallwitz D., 1997. Vesicular transport : how many Ypt/rab-GTPases make a eukaryotic cell ? *TIBS*, 22, 468-472.

Ledakis P., Tanimura H., Fojo T., 1998. Limitations of differential display. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 251, 653-656.

Leteinturier J., Cochet J-P., Marle M., Benigni M., 1991. *L'endive : guide pratique*. CTIFL Ed., Paris, 271 p.

Li G., 1996. Workshop : vesicular transport in mammalian cells minireview. *Rab5 GTPase and endocytosis. Biocell*, 20 (3), 325-330.

Liang P., Pardee A. B., 1992. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science*, 257, 967-971.

Liechenthaler H. K., 1996. Vegetation stress : an introduction to the stress concept in plants. *J. Plant Physiol.*, 148, 4-14.

Lohmann J., Schickle H., Bosch T. C. G., 1995. REN, a rapid and efficient method for non-radioactive differential display and isolation of mRNA. *Biotechniques*, 18 (2), 200-202.

Longly B., Louant B. P., 1987. *Mécanismes de la reproduction chez la chicorée de Bruxelles : fondements et applications à la sélection*. IRSIA, Bruxelles, 108 p.

Lo Schiavo F., Giuliano G., de Vries S. C., Genga A., Bollini R., Pitto L., Cozzani G., Nuti-Ronchi V., Terzi M., 1990. A carrot cell variant temperature sensitive

for somatic embryogenesis reveals a defect in the glycosylation of extracellular proteins. *Mol. Gen. Genet.*, 223, 385-393.

Luce M. J., Burrows P. D., 1998. Minimizing false positives in differential display. *Biotechniques*, 24 (5), 769-770.

Ma H., McMullen M. D., Finer J. J., 1994. Identification of a homeobox-containing gene with enhanced expression during soybean (*Glycine max* L.) somatic embryo development. *Plant Mol. Biol.*, 24, 465-473.

Malhotra K., Foltz L., Mahoney W. C., Schueler P. A., 1998. Interaction and effect of annealing temperature on primers used in differential display RT-PCR. *Nucleic Acids Res.*, 26 (3), 854-856.

Maniatis T., Goodbourn S., Fischer J. A., 1987. Regulation of inducible and tissue-specific gene expression. *Science*, 236, 1237-1244.

Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J., 1982. *Molecular cloning : a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.

Martin-Laurent F., Franken P., Gianinazzi S., 1995. Screening of cDNA fragments generated by differential RNA display. *Anal. Biochem.*, 228, 182-184.

Martinez O., Goud B., 1997. Rab proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 1404, 101-112.

Murashige T., Skoog F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.*, 15, 473-497.

Nagata R., Wada M., Satoh S., Kamada H., Harada H., 1993. A cDNA differentially expressed between embryogenic and nonembryogenic carrot (*Daucus carota* L.) cells. *Plant Physiol.*, 103, 1021.

Nato A., Mirshahi A., Tichtinsky G., Mirshahi M., Faure J-P., Lavergne D., De Buyser J., Jean C., Ducreux G., Henry Y., 1997. *Plant Physiol.*, 113, 801-807.

Nielsen K. A., Hansen I. B., 1992. Appearance of extracellular proteins associated with somatic embryogenesis in suspension cultures of barley (*Hordeum vulgare* L.). *J. Plant Physiol.*, 139, 489-497.

- Bibliographie -

Nomura K., Komamine A., 1986. Molecular mechanisms of somatic embryogenesis. *Oxf. Surv. Plant Mol. Cell Biol.*, 3, 456-466.

Novick P., Brennwald P., 1993. Friends and family : the role of the rab GTPases in vesicular traffic. *Cell*, 75, 597-601.

Olkkonen V. M., Stenmark H., 1997. Role of rab GTPases in membrane traffic. *International Review of Cytology*, 176, 1-85

Park J-H., Oh S. A., Kim Y. H., Woo H. R., Nam H. G., 1998. Differential expression of senescence-associated mRNAs during leaf senescence induced by different senescence-inducing factors in *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.*, 37, 445-454.

Pearson W. R., Lipman D. J., 1988. Improved tools for biological sequence analysis. *PNAS*, 85, 2444-2448.

Perret C. W. and Wathley S. A., 1991. An estimation of the sensitivity of in vitro translation using two-dimensional gel analysis. *Electrophoresis*, 12 : 584-588.

Pitto L., Lo Schiavo F., Giuliano G. and Terzi M., 1983. Analysis of the heatshock protein pattern during somatic embryogenesis of carrot. *Plant Mol. Biol.*, 2 : 231-237.

Poulsen G. B., Frugis G., Albrechtsen M., Mariotti D., 1996. Synthesis of extracellular proteins in embryogenic and non embryogenic cell cultures of alfalfa. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 44, 257-260.

Puupponen-Pimiä R., Saloheimo M., Vasara T., Ra R., Gaugecz J., Kurtén U., Knowles J. K. C., Keränen S., Kauppinen V., 1993. Characterization of a birch (*Betula pendula* Roth.) embryogenic gene, BP8. *Plant Mol. Biol.*, 23, 423-428.

Racusen R. H. and Schiavone M. F., 1990. Positional cues and differential gene expression in somatic embryos of higher plants. In : *Cell Differentiation and Development*, 30, Elsevier Scientific Publishers Ireland, Ltd, 159-169.

Raghow R., 1987. Regulation of messenger RNA turnover in eukaryotes. *Trends in Biochem. Sci.*, 12 : 358-360.

Redhead C. R., Palme K., 1996. The genes of plant signal transduction. Crit. Rev. Plant Sci., 15 (5-6), 425-454.

Reinbothe C., Tewes A., Reinbothe S., 1992a. Altered gene expression during somatic embryogenesis in *Nicotiana plumbaginifolia* and *Digitalis lanata*. Plant Sci., 82 : 47-58.

Reinbothe C., Tewes A., Luckner M., Reinbothe S., 1992b. Differential gene expression during somatic embryogenesis in *Digitalis lanata* analyzed by *in vivo* and *in vitro* protein synthesis. Plant J., 2 (6), 917-926.

Reinert J., 1958. Morphogenese und ihre Kontrolle an Gewebekulturen aus Carotten. Naturwissenschaft, 45, 344-345.

Renkawitz R., 1990. Transcriptional repression in eukaryotes. TIG, 6 (6), 192-197.

Reuber T. L., Ausubel F. M., 1995. Differential mRNA display. In : Methods in cell biology, 49, Academic Press, Inc., 431-440.

Robatche-Claive A-S., Couillerot J-P., Dubois J., Dubois T., Vasseur J., 1992. Embryogenèse somatique directe dans les feuilles du *Cichorium* hybride "474" : synchronisation de l'induction. CR Acad. Sci., série III, 314, 371-377.

Robatche Claive-Blervacq A-S., 1996. Marqueurs précoces des premières divisions embryogènes chez le *Cichorium* hybride "474" : implication du cytosquelette. Thèse GEBM, Lille, 1694.

Saalbach G., Thielmann J., 1995. Isolation and characterization of five cDNA-clones encoding small GTP-binding proteins from field bean (*Vicia faba*). J. Plant Physiol., 145, 665-673.

Sacchi G. A., Pirovano L., Lucchini G., Cocucci S., 1996. A low-molecular-mass GTP-binding protein in the cytosol of germinated wheat embryos. Eur. J. Biochem., 241, 286-290.

Satoh S., Kamada H., Harada H., Fujii T., 1986. Auxin-controlled glycoprotein release into the medium of embryogenic carrot cells. Plant Physiol., 81, 931-933.

- Bibliographie -

Satoh S., Toya T., Kawahara R., Whittier R. F., Fukuda H., Komamine A., 1995. Isolation of a carrot gene expressed specifically during early-stage somatic embryogenesis. *Plant Mol. Biol.*, 28, 39-46.

Satoh Y., Hong S-K., Tagiri A., Kitano H., Yamamoto N., Nagato Y., Matsuoka M., 1996. A rice homeobox gene, OSH1, is expressed before organ differentiation in a specific region during early embryogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 8117-8122.

Schmidt E. D. L., Guzzo F., Toonen M. A. J., de Vries S. C., 1997. A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos. *Development*, 124, 2049-2062.

Sterk P., Booij H., Schellekens G. A., van Kammen A., de Vries S. C., 1991. Cell-specific expression of the carrot EP2 lipid transfer protein gene. *Plant Cell*, 3, 907-921.

Steward F. C., Mapes M. O., Smith J., 1958. Growth and organized development of cultured cells. II. Organization in cultures grown from freely suspended cells. *Am. J. Bot.*, 45, 693-703.

Stirn S., Jacobsen H-J., 1987. Marker proteins for embryogenic differentiation patterns in pea callus. *Plant Cell Reports*, 6, 50-54.

Stirn S., Mordhorst A. P., Fuchs S., Lörz H., 1995. Molecular and biochemical markers for embryogenic potential and regenerative capacity of barley (*Hordeum vulgare* L.) cell cultures. *Plant Sci.*, 106, 195-206.

Sung Z. R., Okimoto R., 1981. Embryonic proteins in somatic embryos of carrot. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78 (6), 3683-3687.

Sung Z. R., Okimoto R., 1983. Coordinate gene expression during somatic embryogenesis in carrots. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80, 2661-2665.

Tagu D., 1999. Principes des techniques de biologie moléculaire. INRA Eds., Versailles, 136 p.

Takahashi Y., Nagata T., 1992. par-B : an auxin-regulated gene encoding glutathione S-transferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 56-59.

- Bibliographie -

Terryn N., Anuntalabhochai S., Van Montagu M., Inzé D., 1992. Analysis of a *Nicotiana plumbaginifolia* cDNA encoding a novel small GTP-binding protein. FEBS, 299 (3), 287-290.

Terryn N., Arias M. B., Engler G., Tiré C., Villarroel R., Van Montagu M., Inzé D., 1993. Rha1, a gene encoding a small GTP binding protein from Arabidopsis, is expressed primarily in developing guard cells. The Plant Cell, 5, 1761-1769.

Terryn N., Van Montagu M., Inzé D., 1993. GTP-binding proteins in plants. Plant Mol. Biol., 22, 143-152.

Thiel G., Battey N., 1998. Exocytosis in plants. Plant Mol. Biol., 38, 111-125.

Toonen M. A. J., Hendriks T., Schmidt E. D. L., Verhoeven H. A., van Kammen A., de Vries S. C., 1994. Description of somatic-embryo-forming single cells in carrot suspension cultures employing video cell tracking. Planta, 194, 565-572.

Toonen M. A. J., de Vries S. C., 1996. Initiation of somatic embryos from single cells. In : Embryogenesis the generation of a plant, Wang T. L., Cuming A. Ed., BIOS scientific publisher, UK, 173-189.

Torelli A., Soragni E., Bolchi A., Petrucco S., Ottonello S., Branca C., 1996. New potential markers of *in vitro* tomato morphogenesis identified by mRNA differential display. Plant Mol. Biol., 32, 891-900.

Uchimiya H., Anai T., Aspuria E. T., Matsui M., Nakano A., Ueda T., 1998. The biological roles of small GTPases and interacting proteins in plants. J. Plant Res., 111, 257-260.

Van Engelen F. A., Sterk P., Booij H., Cordewener J. H. G., Rook W., van Kammen A., de Vries S. C., 1991. Heterogeneity and cell type-specific localization of a cell wall glycoprotein from carrot suspension cells. Plant Physiol., 96, 705-712.

Van Engelen F. A., De Vries S. C., 1992. Extracellular proteins in plant embryogenesis. TIG, 8, 2, 66-70.

Van Hengel A. J., Guzzo F., van Kammen A., de Vries S. C., 1998. Expression pattern of the carrot EP3 endochitinase genes in suspension cultures and in developing seeds. Plant Physiol., 117 (1), 43-53.

Vasil I. K., Hildebrandt A. C., Riker A. J., 1964. Endive plantlets from freely suspended cell groups grown *in vitro*. *Science*, 146, 76-77.

Vasil I. K., Hildebrandt A. C., 1966. Variations of morphogenetic behaviour in plant tissue cultures. I. *Cichorium endivia*. *Am. J. Bot.*, 53, 860-869.

Vasseur J., Dubois J., Hilbert J-L., Couillerot J-P., 1995. Somatic embryogenesis in chicory (*Cichorium* species). In : *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, 31, Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed II, Bajaj Y. P. S. Ed, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 126-137.

Verma D. P. S., Cheon C-I., Hong Z., 1994. Small GTP-binding proteins and membrane biogenesis in plants. *Plant Physiol.*, 106, 1-6.

Vivekananda J., Drew M. C. and Thomas T. L., 1992. Hormonal and environmental regulation of the carrot lea-class gene Dc3. *Plant Physiol.*, 100 : 576-581.

Vierstra R. D., 1993. Protein degradation in plants. *Annu. Rev. Plant Mol. Biol.*, 44 : 385-410.

Wilde H. D., Nelson W. S., Booij H., de Vries S. C., Thomas T. L., 1988. Gene-expression programs in embryogenic and non-embryogenic carrot cultures. *Planta*, 176, 205-211.

Wurtele E. S., Wang H., Durgerian S. Nikolau B. J., Ulrich T. H., 1993. Characterization of a gene that is expressed early in somatic embryogenesis of *Daucus carota*. *Plant Physiol.*, 102, 303-312.

Yeung E. C., 1995. Structural and developmental patterns in somatic embryogenesis. In : *In vitro* embryogenesis in plants, Thorpe T. A. Ed, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 205-247.

Zimmerman J. L., 1993. Somatic embryogenesis : a model for early development in higher plants. *The Plant Cell*, 85, 1411-1423.

Zivy M, 1986. Influence des ampholytes sur la révélation des protéines au nitrate d'argent. In *Recent progresses in Two-Dimensional Electrophoresis*, M. M. Galteau, G. Siest, eds. Presses Universitaires de Nancy, Nancy, 69-72.

ANNEXES

ANNEXES

Tableau 1 : Composition du milieu M17

Macroéléments (mg.l⁻¹)	
MgSO ₄ , 7H ₂ O :	185
CaCl ₂ , 2H ₂ O :	220
NH ₄ NO ₃ :	825
KCl :	750
KH ₂ PO ₄ :	85
Fer-EDTA :	
Na ₂ -EDTA	18,65
FeSO ₄ , 7H ₂ O	13,9
Microéléments (mg.l⁻¹) de Heller (1953)	
ZnSO ₄ , 7H ₂ O :	1
H ₃ BO ₃ :	1
MnSO ₄ , H ₂ O :	0,076
CuSO ₄ , 5H ₂ O :	0,03
AlCl ₃ :	0,05
NiCl ₂ , 6H ₂ O :	0,03
KI :	0,01
Vitamines (mg.l⁻¹) de Morel et Wetmore (1951)	
Pantothénate de Ca :	1
Thiamine :	1
Acide nicotinique :	1
Pyridoxine :	1
Biotine :	0,1
Régulateurs de croissance (mg.l⁻¹)	
Acide Naphtalène Acétique (ANA) :	0,02
6-Diméthylallylamino-Purine (2iP) :	0,5
Autres substances organiques (g.l⁻¹)	
Glutamine :	0,25
Méso-inositol :	0,1
Saccharose :	15/20

pH5,4

Tableau 2 : composition du milieu de Heller

Macroéléments de Heller (mg.l⁻¹)	
NaNO ₃	600
KCl	750
CaCl ₂	75
NaH ₂ PO ₄	108
MgSO ₄	250
Fer-EDTA :	
Na ₂ -EDTA	18,65
Fe-SO ₄	13,9
Microéléments de Heller (1953)	
Vitamines de Morel et Wetmore (1951)	
Substances organiques (g.l⁻¹)	
Méso-inositol :	0,1
Saccharose :	5

Milieu solide.: + 400 mg.l⁻¹ de méso-inositol.
+ 6 g.l⁻¹ d'agar.

pH 5,5.

Tableau 3 : Composition du tampon de lyse ou de solubilisation "UKS" (Zivy,1986).

SDS	1,25%	0,625 g
Ampholines Biorad pH 3 à 10	2%	2,5 ml
Triton x 100	2%	1 ml
Urée	9,5 mM	28,5 g
K ₂ CO ₃	5 mM	0,345 g
Dithiothreitol (DTT)	0,5%	0,25 g
H ₂ O		qsp 50 ml

Tableau 4 : Composition des gels d'isoélectrofocalisation.

Urée	10 g
Acryl/PDA (29,2%/0,8%)*	2,5 ml
H2O ultrapure	6 ml
Triton x 100	2 ml
Ampholines pH 3 à 10	900 µl
pH 5 à 7	100 µl

* **Acryl/PDA (29,2%/0,8%)** :

- 500 ml d'acrylamide 40%
- 166,6 ml d'H2O
- 5,33 g de PDA

Tableau 5 : Composition du gel de séparation d'électrophorèse bidimensionnelle (12,5%).

Acryl/PDA (29,2%/0,8%)*	25 ml
Tris-HCl 1,5 M pH8,8	15 ml
H2O ultrapure	19,1 ml
APS 10%	300 µl
Temed	30 µl

Tableau 6 : Composition du tampon de migration (Laemmli, 1970).

Tris	6 g/l
Glycine	28,8 g/l
SDS	1 g/l

Tableau 7 : Composition du tampon isothiocyanate de guanidium 4M.

<u>Tampon GIT 4 M (pour 200 ml) :</u>	
- GIT	94,53 g
- Acétate de sodium 3 M, pH 6	1,67 ml
- H ₂ O bidistillée stérile traitée au DEPC	q.s.p. 200 ml
- β-mercaptoéthanol	1,67 ml

Tableau 8 : Composition du tampon de chlorure de césium 5,7 M

<u>Tampon Chlorure de Césium 5.7 M (pour 100 ml) :</u>	
- CsCl	95,97 g
- Acétate de potassium 3M, ph 6	0,83 ml
- H ₂ O bidistillée stérile traitée au DEPC	q.s.p. 100 ml

Tableau 9 : Composition des tampons d'accrochage et d'éluion des ARNm.

	Tampon d'accrochage	Tampon d'éluion
Tris-Hcl, pH 7,5, 10mM	X	X
EDTA 1mM	X	X
NaCl 0,3 M	X	
SDS 0,1 %	X	X

Tableau 10 : Composition du mélange réactionnel de transcription inverse.

Reactifs	Volume	Concentration finale
MgCl ₂ 25mM	4 µl	5 mM
Tampon 5X	4 µl	1X
dNTP 10mM	2 µl	1 mM
RNasine 40 U/µl	0,5 µl	20 U
OligodT ₁₂ GC 40 µM	1 µl	2 µM
AMV 23 U/µl	0,65 µl	15 U

0,5 µg d'ARNm sont ajoutés, le volume est ajusté à 20 µl avec de l'eau traitée au DMPC.

Tableau 11 : Liste des amorces aléatoires utilisées pour les réactions de PCR.

KIT B

code	5' to 3'	M.W.	pmoles	ug/tube
OPB-01	GTTTCGCTCC	2961	6363	19.0
OPB-02	TGATCCCTGG	3010	5654	17.0
OPB-03	CATCCCCCTG	2915	6313	18.5
OPB-04	GGACTGGAGT	3099	4892	15.0
OPB-05	TGCGCCCTTC	2946	6473	19.0
OPB-06	TGCTCTGCCC	2946	6473	19.0
OPB-07	GGTGACGCAG	3084	4957	15.5
OPB-08	GTCCACACGG	3004	5377	16.0
OPB-09	TGGGGGACTC	3075	5265	16.0
OPB-10	CTGCTGGGAC	3035	5493	16.5
OPB-11	GTAGACCCGT	3019	5300	16.0
OPB-12	CCTTGACGCA	2979	5531	16.5
OPB-13	TTCCCCCGCT	2906	6821	20.0
OPB-14	TCCGCTCTGG	2986	6159	18.5
OPB-15	GGAGGGTGTT	3130	4988	15.5
OPB-16	TTTGCCCGGA	3010	5654	17.0
OPB-17	AGGGAACGAG	3117	4385	13.5
OPB-18	CCACAGCAGT	2988	5192	15.5
OPB-19	ACCCCCGAAG	2973	5265	15.5
OPB-20	GGACCCTTAC	2979	5531	16.5

Tableau 12 : Composition du mélange réactionnel de PCR :

Réactifs	Volume	Concentration finale
H ₂ O stérile	13 µl	X
dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) 2,5 mM chacun	1 µl	100 µM
MgCl ₂ 25 mM	0,5 µl	500 µM
Oligo dT ₁₂ GC 40µM	1 µl	1,6 µM
Amorce aléatoire 5 µM	1µl	0,2 µM
Tampon 10X*	2,5 µl	1X
Taq DNA polymerase 15 U/µl*	0,03 µl	0,45 U

*La Taq DNA polymerase et le tampon sont fournis par Appligène.

Tableau 13 : Composition du tampon TBE 10X concentré.



Tris	108 g
Acide borique	55 g
EDTA 0,5 M pH6,8	40 ml
H2O	qsp 1 l

Tableau 14 : Composition des gels d'acrylamide pour la séparation des ADNc.

Composés pour 100 ml de gel	Gel de concentration	Gel de séparation
Acryl-bis 30% (29:1)	13ml	20 ml
H ₂ O	76 ml	69,3 ml
TBE 10X	10 ml	10 ml
Temed	120 µl	35 µl
APS	1,2 ml	700 µl

Tableau 15 : Révélation argentique des ADNc en gel de polyacrylamide (Blum et al., 1992; Lohmann et al., 1995).

Etapas	Solutions	Durée du traitement
FIXATION	Acide acétique 10%	20 min. minimum
RINCAGES	H ₂ O bidistillée	3 x 2 min.
IMPREGNATION	AgNO ₃ 0,1% (p/v), formaldéhyde (37%) 0,15% (v/v)	30 min.
RINÇAGE	H ₂ O bidistillée	20 sec.
REVELATION	Na ₂ CO ₃ 3% (p/v), formaldéhyde (37%) 0,1% (v/v), Na ₂ S ₂ O ₃ , 5H ₂ O 0,0002 % (p/v)	2 à 5 min.
RINCAGE	H ₂ O bidistillée	10 sec.
FIXATION	glycine 2% (p/v) Na ₂ EDTA 0,5% (p/v)	10 min

RESUME

Le *Cichorium* hybride "474" (*Cichorium intybus* var. *sativum* x *Cichorium endivia* var. *latifolia*) constitue un modèle de choix pour appréhender le déterminisme de l'embryogenèse somatique. L'origine directe et unicellulaire des embryons, ainsi que la possibilité de synchroniser la 1^{ère} division de la cellule embryogène, favorisent l'étude des étapes précoces, autant au niveau cytologique qu'aux niveaux biochimique et moléculaire.

Notre étude est particulièrement focalisée sur l'expression des gènes au cours de l'embryogenèse somatique. Des expériences de marquage *in vivo* des protéines et de traduction *in vitro* des ARN messagers polyadénylés montrent que de nombreuses modifications interviennent dans l'expression des gènes au cours de l'induction de l'embryogenèse somatique, aussi bien au niveau traductionnel que transcriptionnel. Ceci suggère une reprogrammation importante dans l'expression des gènes dès les premières étapes de ce processus.

Pour caractériser certains gènes exprimés différemment, nous avons utilisé la technique de Differential Display (DDRT-PCR) et parmi les différents ADNc partiels détectés, deux ont été plus particulièrement étudiés. L'un d'entre eux présente des homologies avec un EST répertorié dans les banques de données. Il s'accumule durant la cinétique d'embryogenèse chez le génotype embryogène, alors qu'il est beaucoup moins représenté chez la chicorée "Pévèle" non embryogène cultivée dans les mêmes conditions. Le second ADNc présente de fortes homologies avec des ADNc codant pour une protéine de liaison au GTP de type rab5. Il est visualisé dès la mise en culture chez la chicorée embryogène "474", mais n'est pas amplifié chez la chicorée non embryogène. Par criblage d'une banque d'ADNc et par des expériences de 5'RACE-PCR, nous avons montré l'existence de 4 ARNm correspondant à ce produit. Ils diffèrent particulièrement dans leurs régions non codantes. L'un d'entre eux, détecté dès le 1^{er} jour de la cinétique chez les deux génotypes de chicorée, semble corrélé à la mise en culture *in vitro* des explants; un autre est produit tout au long de la culture chez la variété embryogène alors que sa synthèse cesse à partir du 4^{ème} jour de culture chez la variété non embryogène. Une analyse au niveau génomique suggère que ces deux séquences proviennent de deux gènes distincts. Par analogie avec le règne animal, nous proposons une implication des protéines rab que nous avons identifiées dans le transport vésiculaire au cours de l'embryogenèse somatique chez la chicorée.

Mots clés : embryogenèse somatique, Differential Display, protéine de liaison au GTP, rab5.

SUMMARY

The *Cichorium* hybrid clone "474" (*Cichorium intybus* var. *sativum* X *Cichorium endivia* var. *latifolia*) represents a good model system to investigate early events involved in somatic embryogenesis. Embryos of unicellular origin develop directly from somatic cells, and the opportunity to synchronize the first division of the embryogenic cells in leaves favours cytological, biochemical and molecular studies, since it allows a clear distinction between the acquisition of the morphogenic competence and the development of embryos.

We have focused our studies on gene expression during the induction step of somatic embryogenesis.

In vivo labelling of proteins and *in vitro* translation of polyadenylated mRNA have shown that the expression of genes is strongly altered as well at a transcriptional as at a translational level during the induction of somatic embryogenesis. This suggests a great reprogramming of the gene expression pattern during the first stages of this morphogenic process.

We have applied mRNA differential display (DDRT-PCR) to characterize some genes differentially expressed. Among all the partial cDNAs obtained, two were chosen for further investigations. The first one is homologous to an EST (Expressed Sequence Tag). It is accumulated in the *Cichorium* hybrid's leaves all the culture, whereas it's less abundant in a chicory "Pevele" which is not able to perform embryogenesis in our culture conditions. The second cDNA shows a strong homology with genes coding for GTP binding proteins and particularly with the rab5 subclasse. Its synthesis is induced in the leaves of the embryogenic genotype from the first day of culture, whereas it's not visualized in the non embryogenic one. Screening a cDNA library and by a 5'RACE-PCR, we found four mRNAs encoding for this protein. They are especially different in their non coding regions. One of them seems to be correlated with the culture, since it appears from the first day of culture in the both genotypes. Another one is present all the culture in the embryogenic genotype whereas it disappears from the 4th day in the non embryogenic one. A genomic analysis suggests that these sequences derive from two distinct genes. By analogy with the animal kingdom, we suggest an implication of these proteins in the vesicular transport during somatic embryogenesis in *Cichorium*.

Key words : somatic embryogenesis, Differential Display, GTP-binding-protein, rab5.