

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE
U.F.R DE BIOLOGIE

N° -----

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE 1

Discipline : STRATEGIES D'EXPLOITATION DES FONCTIONS BIOLOGIQUES

présentée par

Jérôme POULAIN

**ETUDE DU ROLE DE GENES CONTROLANT LE CYCLE
CELLULAIRE AU COURS DU DEVELOPPEMENT RACINAIRE DE
CICHORIUM INTYBUS L.
ISOLEMENT ET CARACTERISATION D'UNE CYCLINE MITOTIQUE
DE TYPE B DE CHICOREE.**

Date de soutenance : 18 Septembre 2003

Co-directeurs de thèse : RAMBOUR S. et INZE D.

JURY

M. G. SALLE	Professeur	Université Paris 7	Rapporteur
M. T. BEECKMAN	Docteur ès Sciences	Université Gand	Rapporteur
M. D. INZE	Professeur	Université Gand	
M. S. RAMBOUR	Professeur	UST Lille	
Mme B. HUSS	Maître de Conférence	UST Lille	

Abréviations

1-FFT : 1-fructosane:fructosane fructosyl transférase

1-SST : 1-saccharose:saccharose fructosyl transférase

ABA : Acide abscissique

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ADNc : Acide Désoxyribonucléique complémentaire

ARN : Acide Ribonucléique

ARNm : Acide Ribonucléique messenger

ATP : Adénosine TriPhosphate

CDK : Cyclin-Dependent Kkinase

CKS : Cyclin-Dependent Kinase subunit

CODEHOP : COnsensus-DEgenerate Hybrid Oligonucleotide Primer

CTP : Cytosine TriPhosphate

GTP : Guanidine TriPhosphate

HU : Hydroxyurée

KRP : Kip/Cip Related Protein

Ory : Oryzaline

PCR : Polymerase Chain Reaction

RISC : RNA Interfering Silencing Complex

SiRNA : Small Interfering RNA

TTP : Tyrosine TriPhosphate

X-gal : 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside

Table des Matières

<u>Introduction Générale</u>	1
<u>Etude Bibliographique</u>	5
I. La Chicorée	6
1. La plante	6
2. La culture de la chicorée Witloof	6
II. Le développement racinaire des Angiospermes Dicotylédones	7
1. Organisation des tissus primaires et secondaires de la racine	7
2. Mise en place des différents profils d'organisation : exemple de la racine d'<i>Arabidopsis thaliana</i>	8
2.1 Mise en place du profil apico-basal	10
2.2 Mise en place du profil radial	11
2.3 Formation des racines latérales	13
2.4 Mécanismes morphologiques et physiologiques de la tubérisation	15
2.4.1 Structure et fonction du cambium vasculaire	17
2.4.2 Régulation de l'activité du cambium vasculaire	17
2.4.3 Réorientation métabolique au cours de la tubérisation	18
III) Le cycle cellulaire des plantes supérieures	19
1. Facteurs moléculaires contrôlant la division cellulaire	20
1.1 Les kinases dépendantes des cyclines ou CDKs	20
1.2 Les cyclines, sous-unités régulatrices des complexes CDK/Cycline	22
1.2.1 Les cyclines de type D	22
1.2.2 Les cyclines mitotiques de type A et de type B	23
2. La régulation du cycle cellulaire chez les plantes supérieures	25
2.1 L'entrée en G1 et la transition G1/S	25
2.2 La transition G2/M	26
3. Cycle cellulaire et développement	28
<u>Résultats</u>	32

<u>Chapitre 1</u>	33
Introduction	34
Résultats : Article 1	36
Promoter activity of <i>At;CycA2;1</i> and <i>At;CycB1;1</i> during root development of <i>Cichorium intybus L.</i> cv Witloof	
Abstract	37
Introduction	37
Material and methods	39
Results	40
Discussion	44
References	48
<u>Chapitre 2</u>	51
Introduction	52
Résultats : Article 2	53
Morphological analysis and expression of <i>CycB1;1</i>-GUS in the early stages of <i>Cichorium intybus</i> tuber root formation.	
Abstract	54
Introduction	54
Material and methods	56
Results	58
Discussion	60
References	63
Résultats : Article 3	65
cDNA-AFLP display for the isolation of differentially expressed genes during chicory root development	
Summary	65
Introduction	66
Material and methods	67
Results	69
Discussion	74

References	75
<u>Chapitre 3</u>	78
Introduction	79
Matériels et Méthodes	80
1. Suspensions cellulaires de cellules de chicorée	80
1.1 Conditions de culture	80
1.2 Blocage de la division par des inhibiteurs du cycle cellulaire	80
2. Extraction des ARN totaux	80
3. Quantification des ARN totaux	81
4. Synthèse des ADNc	81
4.1 Synthèse des premiers brins d'ADNc	81
4.2 Polyadénylation des premiers brins	81
4.3 Synthèse des seconds brins d'ADNc	82
5. Techniques de PCR	82
5.1 Définitions d'amorces dégénérées et amplification par PCR	82
5.2 PCR inverse	83
5.2.1 Amplification non spécifique	83
5.2.2 Digestion des ADNc double brin	84
5.2.3 Ligature intramoléculaire des ADNc double brin	84
5.2.4 Amplification des régions flanquantes	85
5.3 PCR en temps réel	85
6. Clonage des produits PCR	86
6.1 Ligature d'un fragment d'ADNc dans le plasmide pGEM[®]-T	86
6.2 Transformation des bactéries compétentes JM109	87
6.3 Contrôle des clones recombinants	87
7. Séquençage des ADNc	87
7.1 Réactions de séquence	88
7.2 Gel de séquence	88
Résultats	90
1. Isolement d'un ADNc partiel de 616pb de <i>Cichorium intybus</i> homologue aux cyclines de type B1	90

2. Isolement de l'ADNc pleine longueur par la technique de PCR inverse	91
3. Etude de l'expression du gène cycB1 de chicorée dans des suspensions cellulaires par la technique de RT-PCR semi quantitative en temps réel	93
3.1 Etude de l'expression de la cycline B1 de chicorée au cours du cycle cellulaire	93
3.2 Expression de Ci;CycB1;1 au cours de la cinétique de croissance des suspensions cellulaire de chicorée	95
Discussion	96
Annexes	98
Annexe 1	99
Annexe 2	100
Annexe 3	103
Annexe 4	105
<u>Discussion générale et perspectives</u>	109
<u>Références bibliographiques</u>	119
<u>Remerciements</u>	130



Introduction générale

Introduction générale

La racine permet non seulement d'ancrer la plante au sol, mais aussi d'y absorber l'eau et les éléments minéraux nécessaires à la croissance de la plante. Pour permettre plus facilement cette absorption, la surface de contact avec le sol est considérablement augmentée par la présence de poils absorbants et par la formation d'un réseau de racines latérales. La racine est aussi le lieu de stockage de substances végétales importantes telles que les hormones (cytokinines, gibbérellines, acide abscissique) ou des substances allélopathiques.

Le développement racinaire peut être séparé en deux phases bien distinctes. Le développement primaire permet la croissance en longueur de la racine ainsi que la formation du réseau de racines latérales, alors que la croissance secondaire entraîne une augmentation du diamètre de la racine. Dans une racine mature, le cortex, composé du rhizoderme, du parenchyme cortical et de l'endoderme, entoure les tissus de la stèle (péricycle, procambium, tissus vasculaires).

A. thaliana présente une organisation tissulaire simple de la racine. Les tissus qui entourent les éléments vasculaires, ne sont composés chacun que d'une couche de huit cellules. Le petit nombre de cellules qui compose les différents tissus de la racine a facilité l'utilisation de techniques d'ablation au laser qui a permis d'étudier le devenir cellulaire au cours du développement. Enfin, un cycle de vie très court (60 jours de graine à graine), un génome de petite taille (120 millions de pb ; 25000 gènes) et la connaissance complète de sa séquence ont permis l'obtention et l'analyse fonctionnelle de milliers de mutants, afin d'étudier le rôle de gènes intervenant dans le développement. Cette plante est alors naturellement devenue un modèle d'étude du développement des plantes supérieures.

Cependant, en plus d'être une plante possédant un grand intérêt agronomique pour la région, la chicorée présente une organisation racinaire beaucoup plus complexe qu'*A. thaliana*. En effet, le nombre de couches cellulaires ainsi que le nombre de cellules par couche sont beaucoup plus importants chez la chicorée. *C. intybus* présente la particularité de développer une racine pivot tubérisée, résultat d'une croissance secondaire importante, couplée à une réorientation métabolique qui aboutit au stockage d'un dérivé sucré, l'inuline. Cette racine tubérisée pourra donner, dans des conditions optimales, un bourgeon étioilé comestible, l'endive (variété *foliosum*), ou être torréfiée afin de produire un succédané de café

(variété *sativum*). *C. intybus* s'impose donc, pour nos recherches, comme un modèle adapté aux études concernant le développement d'une racine tubérisée et de sa structure complexe. d'un développement racinaire complexe.

Au laboratoire, des précédents travaux ont surtout traité du développement racinaire, et en particulier de la tubérisation, par le biais de l'étude des métabolismes azoté et carboné. La chicorée requiert des conditions de nutrition azotée contrôlées. Un apport trop important de nitrate lors de la culture entraîne la production d'endives de mauvaise qualité. Des travaux ont permis d'isoler et de caractériser le gène et le promoteur de la nitrate réductase (Palms *et al.*, 1996; Tétu, 2000). D'autres ont concerné l'activité de la nitrate réductase avant et au cours de la tubérisation (Dorchies et Rambour, 1985; Druart *et al.*, 2000). Dans la racine de chicorée, lors de la tubérisation, le métabolisme carboné consiste, *via* l'augmentation de l'activité enzymatique, à la synthèse et au stockage de l'inuline (Druart *et al.*, 2001).

Parallèlement à l'étude du métabolisme carbone/azote, les travaux présentés dans ce manuscrit concernent le développement racinaire de la chicorée. En effet, comme tout processus de développement, celui de la racine requiert un contrôle très fin du cycle cellulaire. Le cycle cellulaire est composé de quatre phases successives : G1, S (duplication de l'ADN), G2 et M (Mitose). La progression des cellules à travers le cycle cellulaire est régulée, lors des transitions G1/S et G2/M, par des complexes enzymatiques, composés d'une sous-unité catalytique, la kinase dépendante des cyclines (CDK) et d'une sous-unité régulatrice, la cycline. Les cyclines constituent à ce titre la première cible de contrôle du cycle cellulaire. Chez les plantes, deux groupes de cyclines sont présents. Les cyclines D interviennent lors de la transition G1/S, alors que les cyclines mitotiques de type A et B sont responsables de la transition G2/M. Dans nos études, nous avons observé, au cours du développement de la racine de chicorée, l'activité de deux promoteurs de cyclines mitotiques, *cycB1;1* et *cycA2;1*, d'*Arabidopsis thaliana*, dont les activités ont été largement décrites chez cette plante (Ferreira *et al.*, 1994; Burssens *et al.*, 2000). Les travaux ont été réalisés par l'intermédiaire de tests histochimiques GUS sur des chicorées contenant le gène *uidA* d'*E. coli*, codant la β -glucuronidase, est sous le contrôle de l'un ou l'autre de ces deux promoteurs.

L'ensemble des résultats est présenté dans ce manuscrit dans trois chapitres distincts. Le premier chapitre traite de la croissance longitudinale de la racine. L'activité des promoteurs des cyclines B1;1 et A2;1 a été étudiée au cours de la germination, au niveau des apex racinaires ainsi qu'au cours de la formation des racines latérales. Les résultats obtenus

sont présentés dans ce chapitre sous forme d'un article scientifique soumis à *Journal of Experimental Botany*.

Le second chapitre concerne exclusivement la croissance en épaisseur de la racine de chicorée. L'activité du cambium vasculaire a été largement décrite dans les tiges d'angiospermes dicotylédones et de gymnospermes. Cependant, les données bibliographiques ne montrent pas l'existence de telles études au sein des racines. Nous avons donc réalisé une étude morphologique détaillée de la mise en place du cambium vasculaire ainsi que les premiers stades de la croissance en épaisseur. D'autre part, nous avons étudié l'activité du promoteur de la cycline B1;1 d'*A. thaliana*, au cours de la croissance en épaisseur de la racine. Ces travaux sont présentés sous forme d'un article scientifique soumis à *Journal of Experimental Botany*. Les études morphologiques de la mise en place du cambium vasculaire ont permis la réalisation d'autres travaux de recherches menés par la technique de cDNA-AFLP qui concernent les mécanismes moléculaires de la tubérisation qui sont encore très peu connus. Ces travaux ont fait l'objet d'un article publié dans *Journal of Plant Physiology*.

Enfin, dans le troisième chapitre, nous présentons des résultats concernant l'isolement et la caractérisation d'un gène codant une cycline mitotique de type B1 de chicorée: la Ci;CycB1;1. Nous y présentons la séquence d'ADNc de la région codante ainsi que la caractérisation de ce gène. Ces travaux sont complétés par l'étude de l'expression de ce gène dans des suspensions cellulaires de chicorée.

L'ensemble de ces résultats est précédé d'une analyse bibliographique concernant le développement racinaire et le cycle cellulaire chez les plantes supérieures. Une discussion générale et des perspectives liées à ce sujet d'étude viennent clôturer le manuscrit.



Revue Bibliographique

I. La Chicorée

1. La plante

La chicorée est une plante herbacée de la famille des Astéracées qui se développe dans les régions à climat tempéré. La chicorée sauvage est une plante vivace (Sechley *et al.*, 1991) qui croît le long des routes et des chemins. Connue depuis environ 6000 ans, elle était appréciée des plus grands médecins et botanistes grecs pour ses propriétés thérapeutiques. Elle répond aux jolis noms d' «héliotrope», «barbe de capucin» ou encore «fiancée du soleil», car ses fleurs s'ouvrent à l'apparition du soleil. Tout comme le salsifis, le pissenlit et la laitue, elle sécrète un suc laiteux amer et tonique contenant la lactucine et la lactucopricinine. La chicorée en Europe est représentée par trois espèces *Cichorium spinosum* L., *Cichorium endivia* L., et *Cichorium intybus* L. Si la première espèce est très peu cultivée, les deux autres sont particulièrement intéressantes pour leurs caractères agronomiques. *C. endivia* L., plante typiquement annuelle, est sélectionnée pour la consommation des feuilles en salade (scarole ou chicorée frisée). *C. intybus* pousse sous forme annuelle, bisannuelle ou vivace. Elle se sépare en deux cultigrupes cultivés en tant que bisannuelle : le type *foliosum* (chicorée à feuille) qui produit l'endive et le type *sativum* (chicorée à racine ou industrielle) chez lequel la racine est utilisée pour la torréfaction.

2. La culture de la chicorée Witloof

La culture bisannuelle de la chicorée Witloof (*Cichorium intybus* L. var. *foliosum*) aussi appelée « chicorée de Bruxelles » est une déviation du cycle naturel. Semée en Avril-Mai, la plante développe une rosette de feuilles, puis une racine pivot tubérisée (septembre-octobre). La particularité de la racine tubérisée de chicorée est qu'elle emmagasine des fructosanes, polymères de fructose, tel que l'inuline. Les fructosanes représentent plus de 80% de la matière sèche et sont la seule source carbonée du métabolisme lors de l'étape de forçage (Fouldrin et Limami, 1993). De plus, l'hydrolyse de l'inuline permet la production de sirops de fructose (Améziane *et al.*, 1995).

Le cycle naturel peut être interrompu en fin de phase végétative : les feuilles composant la rosette sont coupées et les racines sont récoltées. Ces dernières sont conservées à 0°C durant deux semaines pour provoquer la vernalisation, puis sont soumises au forçage en les plaçant dans des conditions de cultures hydroponiques (18°C, obscurité, hygrométrie

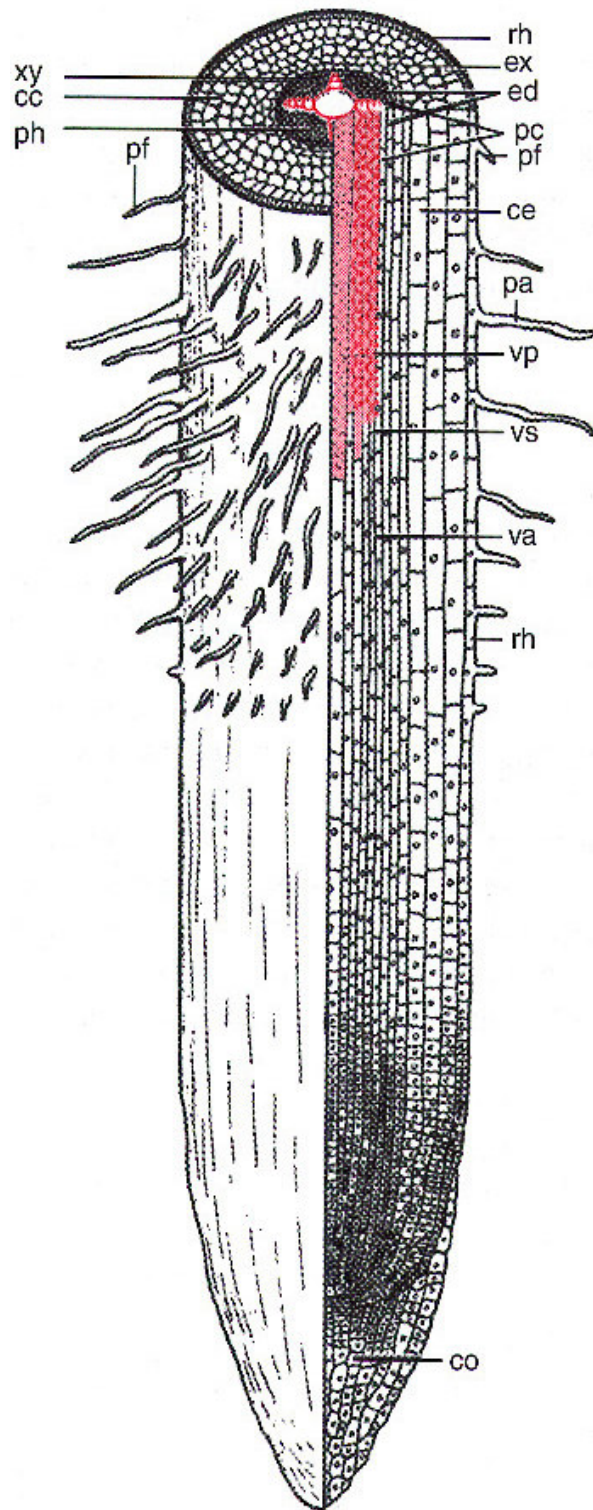


Figure 1 : Schéma de la structure d'une racine d'Angiosperme Dicotylédone.

Vue tridimensionnelle, à gauche en vue externe, à droite en coupe longitudinale, en haut en coupe transversale (extrait de Botanique Générale, Nultsch W., 1998)

cc= cylindre central, ce= cellules corticales, co= coiffe, ed= endoderme, ex= exoderme, pa= poils absorbants, pc= péricycle, pf= poils absorbants flétris, ph= phloème, rh= rhizoderme, va= vaisseaux annelés, vp= vaisseaux ponctués, vs= vaisseaux spiralés, xy= xylème.

saturante). Cette méthode permet de produire un bourgeon étiolé, l'endive, à partir du bourgeon central de la rosette.

II. Le développement racinaire des Angiospermes Dicotylédones

Les racines, délimitées d'une part par le collet et d'autre part par le méristème racinaire, ont pour rôle non seulement de fixer la plante au sol, mais aussi d'y absorber l'eau et les éléments minéraux essentiels à la croissance de la plante. Pour permettre plus facilement cette absorption, la surface de contact avec le sol est considérablement augmentée par la présence de poils absorbants et par la formation d'un réseau de racines latérales. Les racines présentent deux axes de croissance distincts. La croissance primaire permet la croissance longitudinale de la racine. Elle est initiée au niveau du méristème apical racinaire. La croissance secondaire ou radiale entraîne une augmentation du diamètre de la racine. Elle est permise par l'activité de deux méristèmes secondaires, les cambiums libéro-ligneux et subéro-phellodermiques. Ceci est notamment le cas des racines tubérisées, résultant d'un épaissement important de la racine principale à la suite d'une forte activité de la croissance secondaire. Ces racines deviennent alors un organe de stockage de substances de réserve. Enfin, les racines sont encore des lieux de synthèse de substances végétales importantes telles que les hormones (cytokinines, gibbérellines, acide abscissique) ou des substances allélopathiques.

1. Organisation des tissus primaires et secondaires de la racine

Les Angiospermes Dicotylédones présentent en général une organisation tissulaire similaire (figure 1). La couche la plus externe des racines est le rhizoderme ou épiderme racinaire. Il est composé de deux types de cellules, les trichoblastes et les atrichoblastes. Seuls les premiers sont capables de se différencier en poils absorbants pour permettre d'étendre la surface de contact entre la racine, et l'eau et les éléments minéraux du sol. Juste sous le rhizoderme se trouve le cortex principalement constitué de cellules parenchymateuses. Il occupe l'espace situé entre la stèle et le rhizoderme. A l'intérieur du cortex se situe l'endoderme, couche unique de cellules qui joue le rôle de barrière sélective réglant ainsi le passage des substances issues du sol vers les tissus conducteurs de la stèle. Pour ce faire, les parois de ces cellules sont imprégnées d'une substance hydrophobe proche de la subérine. Ces imprégnations localisées forment le cadre de Caspary et empêchent toute diffusion incontrôlée

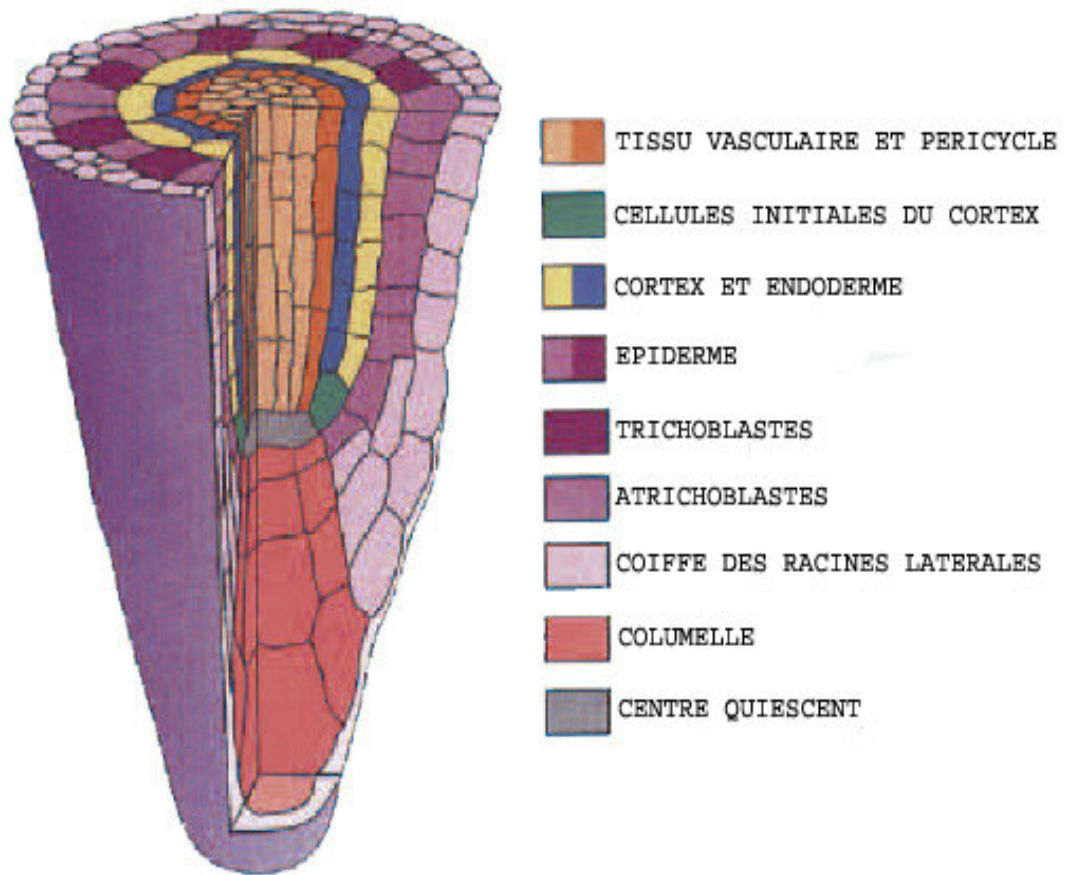


Figure 2 : Représentation schématique de la racine d'*Arabidopsis thaliana* (d'après Van den Berg *et al.*, 1998)

de l'eau et des éléments minéraux par la voie apoplastique à travers les espaces extracellulaires. L'eau et les minéraux empruntent donc la voie symplastique, c'est à dire à travers le cytoplasme des cellules.

Le centre de la racine est occupé par la stèle. Celle-ci est composée du péricycle, des tissus vasculaires et suivant les cas, de tissus à vocation de méristèmes secondaires (procambium et cambium libero-ligneux). Certaines cellules du péricycle peuvent se dédifférencier pour former un nouveau méristème. Les divisions au sein de ce méristème donneront naissance aux racines latérales. Les tissus vasculaires sont composés de xylème et de phloème. Le xylème permet de transporter la sève brute (eau et éléments minéraux) vers les feuilles, alors que le phloème permet la conduction de la sève élaborée vers les organes utilisateurs ou vers les organes de réserve.

Les tissus secondaires sont issus des cambiums vasculaires et subéro-phellodermiques. Le premier se met en place à l'intérieur de la stèle à partir des cellules du procambium entre le phloème et le xylème. L'assise cambiale forme le xylème secondaire ou bois vers l'intérieur et le phloème secondaire ou liber vers l'extérieur. Au fur et à mesure de la croissance en épaisseur de la racine, les cellules du rhizoderme et du cortex se desquament. Lorsque le péricycle arrive à l'extérieur de la racine, il donne naissance au second cambium : le cambium subéro-phellodermique. Celui-ci est à son tour à l'origine du périderme qui constitue le nouveau tissu de protection de l'organe.

2. Mise en place des différents profils d'organisation : exemple de la racine d'*Arabidopsis thaliana*

Chez les animaux multicellulaires, les tissus et les profils d'organisation sont déterminés pendant l'embryogenèse. Chez les plantes, la mise en place de ces profils n'est pas limitée à l'embryogenèse, mais continue tout au long de la vie de la plante, résultat de l'activité des méristèmes. Deux de ces méristèmes (caulinaire et racinaire), formés durant l'embryogenèse, se trouvent à chaque extrémité de l'axe apico-basal de l'embryon.

La racine d'*A. thaliana* présente une organisation tissulaire simple (figure 2). Dans les différents tissus, chaque file de cellule ne comporte qu'un petit nombre de cellules, souvent constant et facilement observable en coupe transversale. Le cortex, l'endoderme et le péricycle ne comptent chacun que huit rangées de cellules. Au centre, la stèle comporte deux pôles de xylème et deux pôles de phloème en position alterne. Les tissus vasculaires sont entourés par des monocouches cellulaires formant successivement le péricycle, l'endoderme,

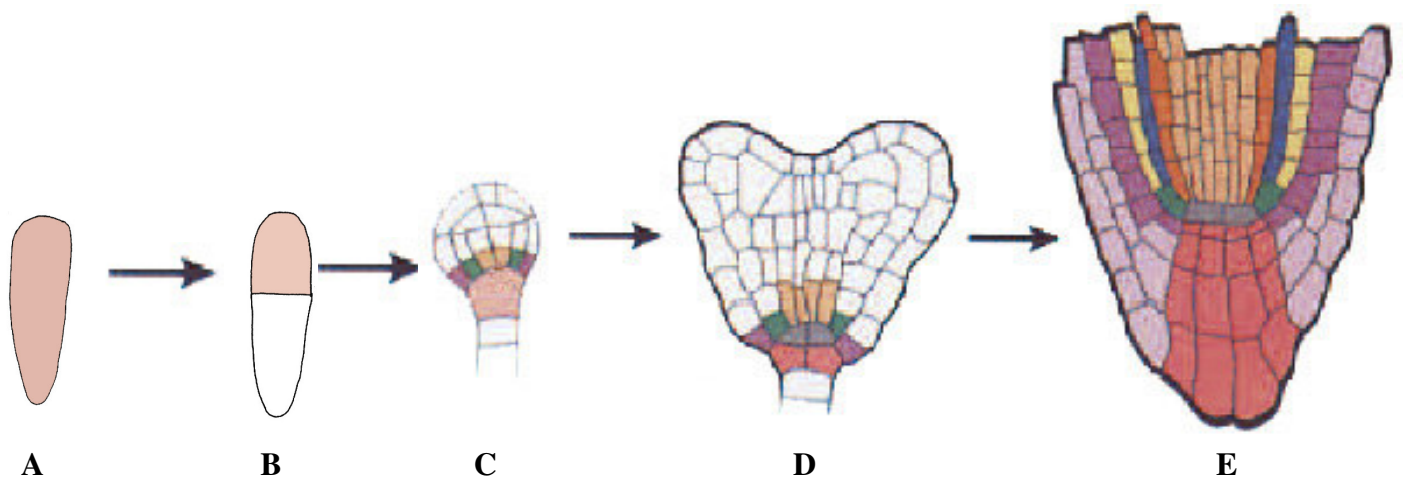


Figure 3 : Schéma du devenir cellulaire durant l'embryogenèse zygotique chez *Arabidopsis thaliana*. **A:** Zygote. **B:** première division asymétrique du zygote. **C:** embryon au stade globulaire. **D:** embryon au stade cordiforme; toutes les cellules initiales sont présentes. **E:** Apex racinaire d'un embryon mature.

le cortex et le rhizoderme. A l'extrémité apicale de la racine, on dénote la présence de la columelle qui donnera naissance aux cellules de la coiffe. Enfin, dans la partie apicale de la racine, la columelle se prolonge par une couche de cellules qui entoure le rhizoderme. Ces cellules forment la partie latérale de la coiffe.

Les files cellulaires des différents tissus trouvent leur origine au niveau d'un petit nombre de cellules mitotiquement actives. Ces dernières sont situées dans la partie apicale de la racine où elles forment la zone méristématique (figure 2). Les cellules de cette zone se divisent activement pour former les cellules initiales des tissus. Ces initiales sont regroupées pour former trois méristèmes bien distincts : des initiales génèrent les tissus de la stèle; elles composent le procambium. D'autres initiales forment à la fois les cellules du rhizoderme et les cellules de la partie latérale de la coiffe; elles composent le protoderme. Enfin, une dernière sorte d'initiales est à l'origine des cellules corticales et de l'endoderme, formant ainsi le méristème fondamental. Toutes ces cellules initiales se situent au contact des quatre cellules formant le centre quiescent.

L'organisation tissulaire de la racine est établie durant l'embryogenèse. Chez Arabidopsis, la première division asymétrique du zygote entraîne la formation d'une petite cellule apicale et d'une grande cellule basale (figure 3). La cellule apicale, petite, constitue le proembryon (nom donné à l'embryon avant le stade globulaire), alors que la cellule basale, plus volumineuse, en contact avec le tissu maternel va se diviser pour donner le suspenseur (dont la cellule la plus basale est appelée hypophyse). Des divisions longitudinales et transversales du proembryon au stade quatre cellules permettent de donner naissance à l'embryon au stade globulaire. A ce stade, aucun organe n'est présent, mais il existe déjà des groupes de cellules individualisés. Ces cellules vont donner naissance aux cellules du méristème racinaire, appelées initiales (figure 3). Le protoderme va donner les initiales du rhizoderme et de la partie latérale de la coiffe, le méristème fondamental qui engendre lui les initiales du cortex et de l'endoderme, et enfin le procambium qui lui, donne naissance aux initiales des tissus vasculaires. Quand à l'hypophyse, elle engendre les initiales de la coiffe (ou columelle) et le centre quiescent (figure 4).

La racine se développe suivant trois profils d'organisation. Le profil apico-basal se met en place durant l'embryogenèse à partir de la première division asymétrique de la cellule-œuf. Le profil radial se met en place à partir du stade globulaire; il permet la séparation des différents tissus de la racine. Enfin, le profil circonférentiel permet la différenciation entre les trichoblastes et les atrichoblastes au niveau du rhizoderme.

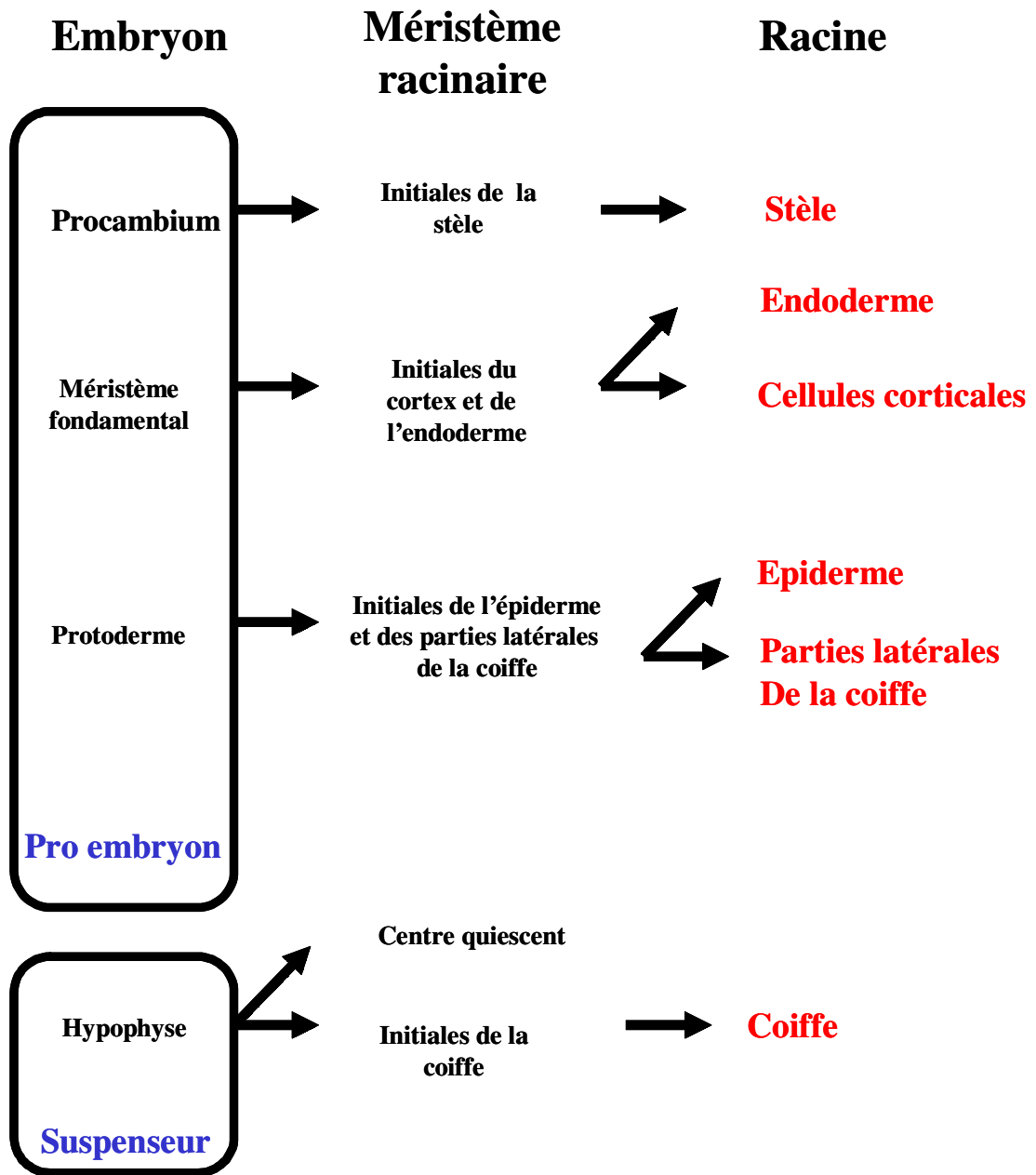


Figure 4 : Origine des différentes lignées cellulaires de la racine. Les cellules sont issues à la fois du proembryon et du suspenseur. D'après Howell (1998).

2.1 Mise en place du profil apico-basal

Afin d'étudier la filiation et le devenir des cellules durant des stades très précoces de l'embryogenèse, de nombreux mutants présentant des aberrations du développement embryonnaire ont été isolés chez *A. thaliana*. L'étude de ces mutants a permis d'étudier l'organisation apico-basale des cellules au cours de l'embryogenèse.

Les mutations dans le gène *MONOPTEROS* entraînent la formation de jeunes plantules sans racine ni hypocotyle (Berleth et Jürgens, 1993). Dans ces mutants, des modifications sont observables dès le stade huit cellules de l'embryogenèse. Au stade triangle, les cellules constituant le tiers inférieur ainsi que l'hypophyse se divisent de manière anarchique (figure 5b) par rapport au type sauvage (figure 5a). Parmi ces cellules, celles responsables de la formation des tissus vasculaires ne produisent pas de files de cellules allongées. Enfin, à la base de l'embryon, se forme un alignement de cellules en contact avec le suspenseur. Dans tous les organes, les cellules composant les tissus vasculaires ne sont pas totalement différenciées. De plus les contacts entre ces cellules ne sont pas optimaux (Przemeck *et al.*, 1996). Le gène *MONOPTEROS* a donc une fonction précoce dans la formation des tissus vasculaires et dans la mise en place du profil apico-basal (Hardtke et Berleth, 1998). La caractérisation du gène *MONOPTEROS* montre une homologie avec le facteur de transcription ARF1 d'*A. thaliana* étudié antérieurement par Ulmasov *et al.* (1997). Ce facteur de transcription a été décrit comme se liant à des promoteurs de gènes régulés par les auxines. *MONOPTEROS* coderait une protéine régulant l'expression de gènes en réponse à un signal auxinique.

Les mutants *hbt* du gène *HOBBIT* possèdent des cotylédons, un hypocotyle et une petite racine embryonnaire. Ils présentent une désorganisation du méristème racinaire. De plus, ces mutants possèdent des racines latérales qui se développent anormalement (Willemsen *et al.*, 1998). Les premiers effets de la mutation sont visibles dès le stade quadrant de l'embryogenèse. A partir de ce stade, des divisions atypiques apparaissent dans le suspenseur qui donne naissance, chez le sauvage, à l'hypophyse, engendrant une absence de centre quiescent et de columelle. Au stade cœur, les divisions des cellules initiales sont réduites voire inexistantes. Cette mutation affecte également les cellules à l'origine de la partie latérale de la coiffe. Le gène *HBT* est donc essentiel, lors de l'embryogenèse, à la formation du méristème racinaire. Des aberrations apparaissent également plus tardivement lors du développement racinaire. Ces observations suggèrent que le gène *HBT* a non

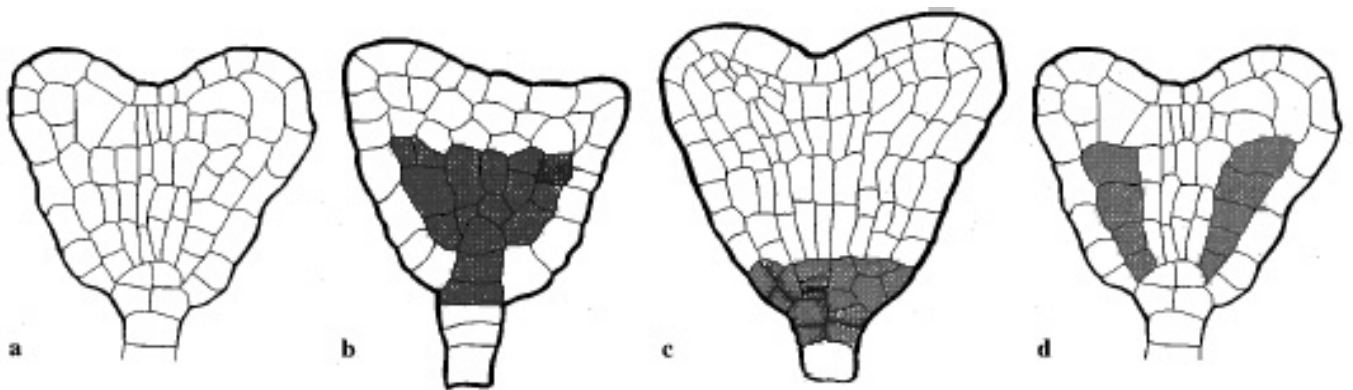


Figure 5: Représentations schématiques d'embryons d'*Arabidopsis thaliana* mutants au stade cœur. Les régions affectées chez les mutants sont grisées. **a:** type sauvage. **b:** mutant « monopteros »; présence d'un empilement central de cellules en continuité avec le suspenseur. **c:** mutant « hobbit »; absence de divisions des cellules dérivant de l'hypophyse et du méristème racinaire. **d:** mutants « scarecrow/shortroot »; absence de divisions périclines des cellules du parenchyme cortical (d'après Van den Berg *et al.*, 1998).

seulement un rôle lors de l'embryogenèse, mais aussi lors du développement post-embryonnaire de la racine. Blilou *et al.* (2002) ont isolé et caractérisé le gène *HBT*. Ce gène code une protéine homologue à la protéine CDC27/Nuc2 composant le complexe APC (Anaphase Promoting Complex). L'introduction du gène *HBT* dans des mutants *nuc2* de *Schizosaccharomyces pombe* restaure partiellement les problèmes de division. Ils ont également mis en évidence chez les mutants *hbt*, l'accumulation au sein des méristèmes d'un inactivateur de transcription régulé par les auxines. Le gène *HBT* jouerait donc deux rôles dans la balance division/différenciation. D'une part, il régulerait la progression du cycle cellulaire dans les méristèmes. D'autre part, il réprimerait la réponse à des facteurs de différenciation. Enfin, la colocalisation des transcrits du gène *HBT* et de la cycline B2;2 (une des sous-unités régulatrices des complexes CDK/cycline, contrôlant la transition G2/M du cycle cellulaire) montre une accumulation conjointe des deux types de transcrits dans les mêmes cellules. L'expression du gène *HBT* est variable selon les phases du cycle cellulaire avec un pic autour de la transition G2/M.

2.2 Mise en place du profil radial

La mise en place du profil d'organisation radiale de la racine a été étudiée à l'aide de deux approches différentes.

Van den Berg *et al.* (1995) ont utilisé un rayon laser pour détruire de manière ciblée des cellules du méristème racinaire d'*A. thaliana*. Dans un premier temps, ils ont détruit les cellules du centre quiescent. Ils ont observé que les cellules mortes étaient remplacées par des cellules du cylindre central adjacentes au centre quiescent. L'ablation d'une seule cellule du centre quiescent entraîne l'arrêt des divisions de l'initiale de la columelle qui se trouve en contact direct avec la cellule détruite (Van den Berg *et al.*, 1997).

Un des événements principaux de la mise en place du profil radial est la division péricline de la cellule fille issue de la cellule initiale du cortex/endoderme (figure 6a). A la suite de l'ablation au laser, la cellule initiale du cortex/endoderme est remplacée par la cellule adjacente du péricycle qui, elle, subit une division péricline (Van den Berg *et al.*, 1995; figure 6b). L'ablation d'une cellule -fille n'a aucun effet sur la mise en place du profil radial (figure 6c); elle est remplacée par une nouvelle division transversale d'une cellule initiale. Enfin l'ablation de trois cellules -filles voisines bloque la division péricline de la cellule qui se trouve en contact direct avec les cellules détruites, inhibant ainsi la formation du cortex et de l'endoderme (figure 6d). Ces expériences tendent à montrer que la position des cellules joue

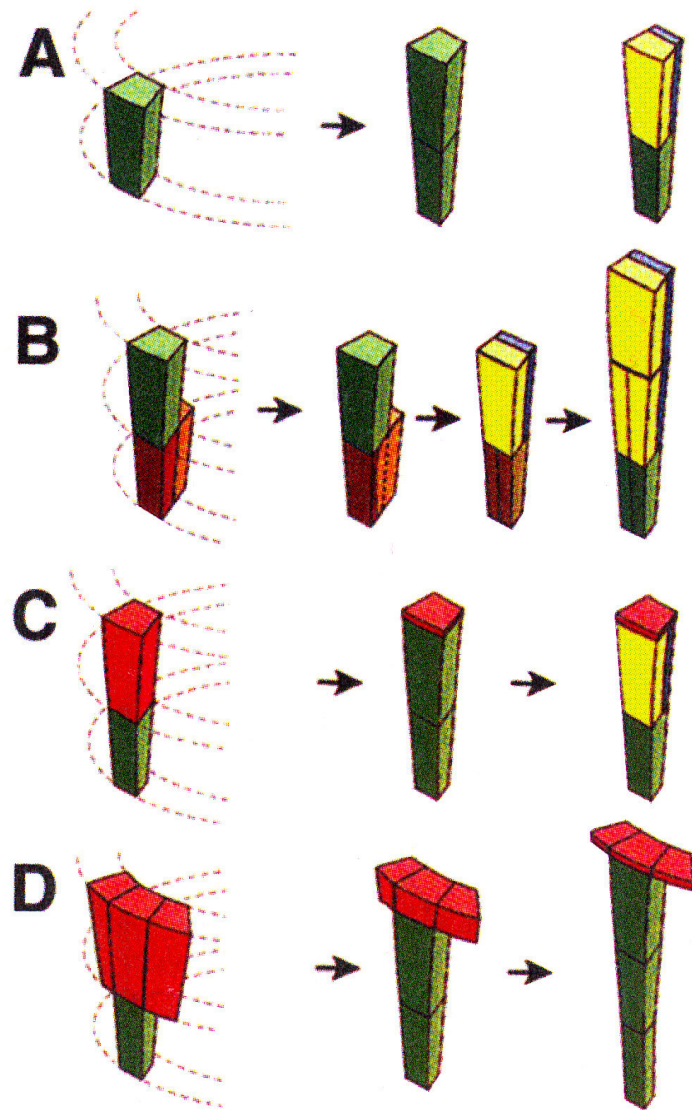


Figure 6 : Représentation schématique des expériences d'ablation au laser réalisées chez *Arabidopsis thaliana* (d'après Van den Berg *et al.*, 1995). **A :** division transversale de la cellule initiale du cortex/endoderme (vert) puis division péricline de la cellule fille (jaune) pour engendrer les deux tissus : cortex et endoderme (jaune et bleu) . **B :** ablation de la cellule initiale du cortex/endoderme (rouge), remplacée par la cellule du péricycle adjacente (orange). **C :** ablation de la cellule fille (rouge) qui n'a aucun effet sur la cellule initiale (vert). **D :** ablation de trois cellules filles adjacentes (rouge) à une cellule initiale (vert); absence de division péricline de la cellule initiale.

un rôle dans l'acquisition de l'identité cellulaire. Les méristèmes ne sont donc pas le point central du devenir des cellules (Van den Berg *et al.*, 1995).

L'autre approche a consisté comme précédemment à l'isolement et à la caractérisation de plusieurs mutants responsables de défauts d'organisation du profil radial (Van den Berg *et al.*, 1998). Parmi ces mutants, *scarecrow (scr)* et *shortroot (shr)* entraînent la perte d'une couche de cellules entre le rhizoderme et le péricycle (figure 5d). Les mutants *shr* ne présentent pas d'endoderme alors que les mutants *scr* ne possèdent qu'une seule file de cellules exprimant à la fois des marqueurs du cortex et de l'endoderme (Di Laurenzio *et al.*, 1996). Les phénotypes de ces deux mutants sont observables dès le stade cœur de l'embryogenèse. A ce stade, la division péricline, qui donne habituellement naissance aux files de cellules corticales et d'endoderme, n'a pas lieu (figure 5d). Le mutant *fass* présente des divisions périclines supplémentaires dans toutes les files de cellules.

Des doubles mutants *fass/scr* et *fass/shr* ont été obtenus par croisement (Scheres *et al.*, 1995). Les doubles mutants *fass/shr* présentent plusieurs couches de cellules corticales, mais l'endoderme n'est pas restauré. Le gène *SHR* est donc spécifique de la formation de l'endoderme. Par contre, les doubles mutants *fass/scr* présentent une couche d'endoderme entourée par plusieurs couches de cellules corticales. Le gène *SCR* contrôlerait donc la division péricline des cellules-filles du cortex/endoderme, permettant la séparation du cortex et de l'endoderme. Di Laurenzio *et al.* (1996) ont cloné et caractérisé le gène *SCR* chez *A. thaliana*. Il code un facteur de transcription de la famille GRAS (*GAI*, *RGA*, *SCR*; Pysch *et al.*, 1999). Des expériences d'hybridation *in situ* ont montré que le transcrit du gène *SCR* était présent dans les initiales du cortex/endoderme, mais aussi dans toutes les cellules de l'endoderme. Le facteur de transcription *SCR* pourrait donc, d'une part réguler la division péricline des initiales corticales, mais aussi jouer un rôle dans la différenciation des cellules endodermiques.

Le gène *SHR* code lui aussi un facteur de transcription putatif de la famille GRAS (Nakajima *et al.*, 2001). Contrairement au gène *SCR* qui est exprimé dans les cellules initiales du cortex/endoderme où il est requis pour la division péricline. Les ARNm du gène *SHR* sont exclusivement retrouvés dans les cellules de la stèle. La protéine *SHR*, quand à elle, migre de la stèle vers l'endoderme. La protéine *SHR* jouerait donc à la fois le rôle d'un signal provenant de la stèle et d'un activateur de la formation et de la différenciation des cellules de l'endoderme par le biais du contrôle du facteur de transcription *SCR*.

Enfin, les mutations touchant le gène *WOODEN LEG (WOL)* ont pour conséquences la formation d'un petit nombre de cellules vasculaires. De plus, toutes ces cellules s'orientent

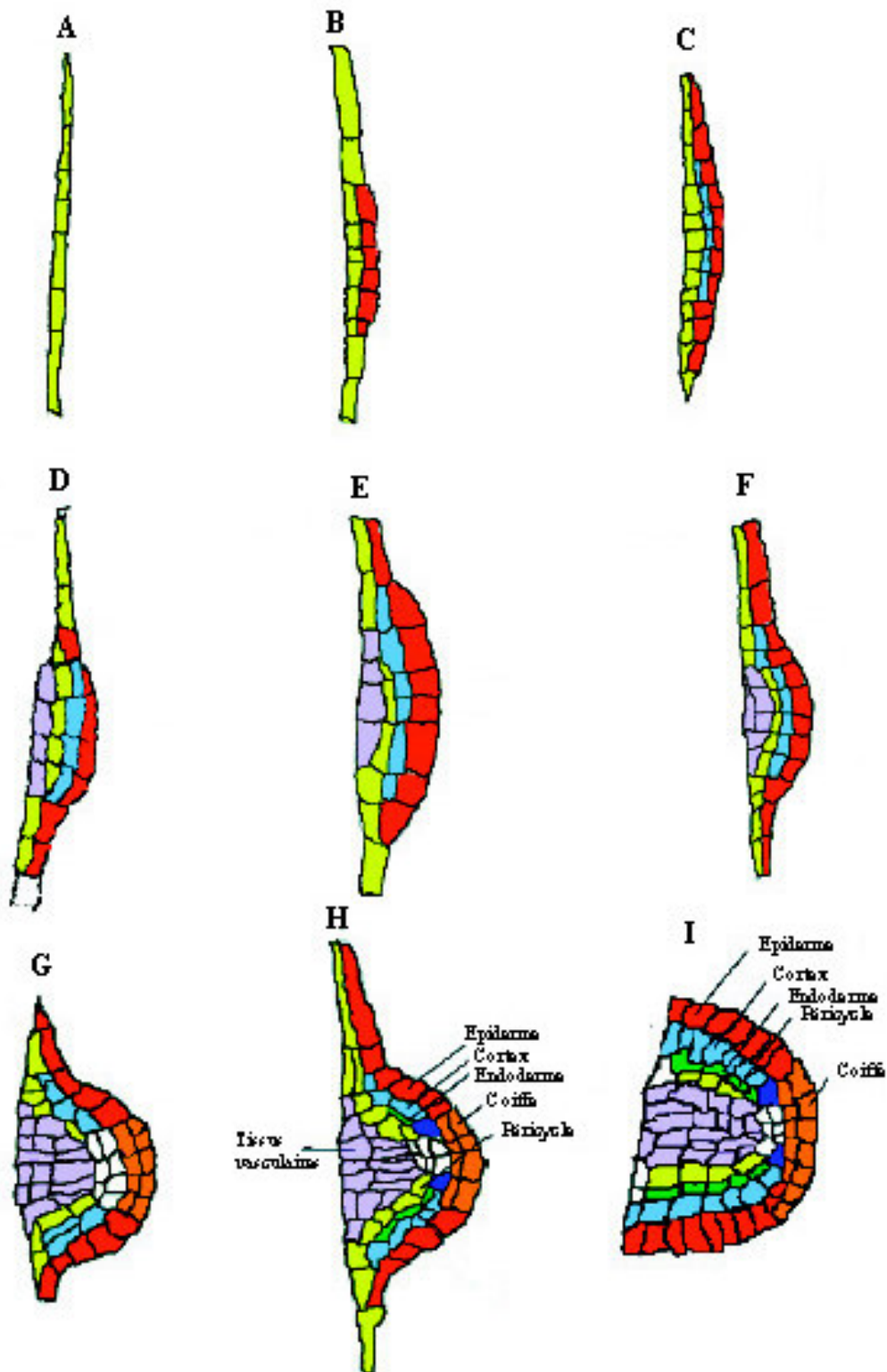


Figure 7 : Modèle de développement des racines latérales chez *A. thaliana*. A : stade I, B : stade II, C : stade III, D : stade IV, E et F : stade V, G et H : stade VI, I : stade VII. Les couleurs permettent de suivre le devenir des cellules au cours du développement : jaune=péricycle; rouge=rhizoderme; bleu ciel=cortex; vert=endoderme; violet=tissus vasculaires; bleu=initiales du cortex/endoderme; orange=coiffe. D'après Malamy et Benfey (1997).

vers une différenciation en xylème (Scheres *et al.*, 1995). Le gène *WOL* est donc essentiel dans un premier temps pour la division cellulaire des initiales des tissus vasculaires, mais aussi dans un second temps pour la détermination des caractères du phloème.

2.3 Formation des racines latérales

Durant toute la vie de la plante, de nombreuses racines latérales sont formées à partir de la racine principale. Ces racines latérales présentent elles-mêmes des ramifications. Le nombre et la position de ces racines latérales déterminent l'architecture du système racinaire. Contrairement à la majeure partie des organes, les racines latérales sont entièrement formées de manière post-embryonnaire à partir d'un petit nombre de cellules différenciées.

Chez la majeure partie des espèces végétales, les racines latérales se forment à partir de cellules du péricycle adjacentes aux pôles de xylème primaire. Cependant chez *Daucus carota* ou *Zea mays*, les racines latérales se forment à partir de cellules du péricycle situées face aux pôles de phloème primaire (Casero *et al.*, 1995). Par contre, chez toutes les espèces, la formation d'une racine latérale débute toujours par une division asymétrique de deux cellules de péricycle d'une même file cellulaire (Casimiro *et al.*, 2003). Des cellules situées sur les files adjacentes à cette file vont aussi subir une série de divisions asymétriques. Puis les petites cellules ainsi formées vont toutes subir une division péricline permettant de former une deuxième rangée de cellules du péricycle, constituant ainsi le début du primordium de la future racine latérale. Des divisions symétriques et asymétriques nombreuses vont ensuite permettre la croissance du primordium jusqu'à l'émergence de la racine latérale. Chez *A. thaliana* la formation des racines latérales a été divisée en sept stades successifs avant l'émergence (Malamy et Benfey, 1997). L'initiation d'une racine latérale démarre avec des divisions perpendiculaires à l'axe apico-basal aboutissant à la formation de huit à 10 petites cellules du péricycle qui présentent une élongation radiale (figure 7A). Ces cellules subissent ensuite une série de trois divisions périclines qui permet de former un dôme composé de quatre rangées de cellules (figure 7 A-D). La cellule centrale des deux files les plus externes subit alors une division anticline pour former quatre cellules cubiques. Puis les cellules adjacentes à ces dernières subissent une division péricline pour former une cinquième file cellulaire (figure 7E et 7F). Par la suite les cellules de ces cinq files subissent une série de divisions périclines et anticlines plus complexes pour former un primordium de racine latérale dont l'organisation ressemble à celle d'un apex d'une racine mature (figure 7 G -I). A partir de ce stade, les cellules initiales constituant le méristème de la racine latérale sont présentes.

L'émergence de la racine latérale ne passe pas par la division des cellules initiales, mais par une élongation cellulaire des cellules du primordium. Le méristème racinaire ne devient actif qu'après l'émergence de la racine latérale (Malamy et Benfey, 1997).

De nombreux travaux récents ont montré l'implication de facteurs endogènes et exogènes régulant la formation des racines latérales. Parmi ces facteurs, le plus étudié est sans doute l'auxine. Chez *A. thaliana*, l'étude des mutants de la formation des racines latérales met en évidence majoritairement des problèmes liés aux auxines (Casimiro *et al.*, 2003). Casimiro *et al.* (2001) ont traité des plantules d'*A. thaliana* avec un inhibiteur du transport d'auxines, l'acide N-1-naphthylphthalamique (NPA). Le NPA réduit le transport basipète des auxines de l'apex racinaire vers les parties les plus âgées de la racine, entraînant une baisse considérable de la quantité d'auxine dans les tissus âgés de la racine. Ils ont pu ainsi observer que l'ajout de fortes concentrations de NPA bloque l'initiation des racines latérales en empêchant la première division transversale des cellules du péricycle. Le transport basipète de l'auxine est donc essentiel à l'initiation des racines latérales. Reed *et al.* (1998) ont montré quant à eux que l'inhibition du transport acropète des auxines (des feuilles vers les racines) entraînait une diminution significative du nombre d'émergences de racines latérales. Ils en ont donc conclu que le transport acropète des auxines était essentiel à l'émergence des racines latérales. Les transports basipète et acropète des auxines agiraient donc indépendamment, et respectivement, au niveau de l'initiation des racines latérales et au niveau de l'émergence. Les auxines sont en fait essentielles à différents moments du développement des racines latérales. De très jeunes primordiums de racines latérales qui ont été excisés sont capables de continuer leur développement en présence d'acide indole-3-acétique (AIA ; Dubrovsky *et al.*, 2001). Par contre, lors des phases plus tardives du développement, les primordiums deviennent indépendants des auxines exogènes, montrant ainsi qu'ils doivent contenir des cellules jouant le rôle de sources d'auxines (Casimiro *et al.*, 2003).

La protéine AUX1 est un transporteur d'auxine. Elle est située dans les cellules du protophloème de la racine au niveau de la face basale de la membrane plasmique, où elle faciliterait le transport acropète des auxines. Des plantules d'*A. thaliana* ne possédant pas la protéine AUX1, n'accumulent pas l'AIA au niveau de l'apex racinaire (Swarup *et al.*, 2001). Elle présentent aussi une diminution de 50 % du nombre d'initiation de racines latérales (Marchant *et al.*, 2002). Le transport acropète des auxines vers l'apex racinaire semble donc essentiel à la formation des racines latérales. De, plus Bhalerao *et al.* (2002) ont montré l'existence d'une accumulation brutale de la quantité d'auxines dans les racines lors de l'émergence de racines latérales. La décapitation des tissus aériens bloque cette accumulation

ainsi que l'émergence des racines latérales. La formation des racines latérales semble ainsi dépendante de la synthèse d'auxines au niveau des parties aériennes de la plante.

D'autres travaux ont montré l'importance des nutriments sur la formation des racines latérales. Par exemple, chez *A. thaliana*, l'étude de la nutrition azotée a montré trois effets différents de cette nutrition sur la formation des racines latérales, qui semblent agir à des stades différents. Un rapport élevé carbone/azote inhibe l'initiation des racines latérales en bloquant le transport de l'auxine depuis les parties aériennes vers les racines (Malamy et Ryan, 2001). D'un autre côté, des quantités trop importantes de nitrate inhibent la formation des racines latérales en agissant juste après l'émergence lorsque le méristème devient actif (Signora *et al.*, 2001). En fait, les plantules qui poussent sur un milieu très riche en nitrate présentent un nombre de racines latérales identiques aux plantules qui poussent sur un milieu à faible teneur en nitrate. Cependant, ces racines latérales montrent un défaut d'allongement (Zhang et Forde, 1999). Enfin, l'application locale de nitrate au niveau de racines entraîne une accélération de la croissance des racines latérales dans les zones traitées, mais n'a aucun effet sur le nombre de racines latérales formées (Zhang et Forde, 2000).

L'acide abscissique (ABA) joue, quant à lui, un très grand rôle dans l'inhibition de la formation des racines latérales par le biais de fortes doses de nitrates (Signora *et al.*, 2001). En effet, l'application de quantités importantes d'ABA exogène stimule l'effet inhibiteur d'une forte concentration en nitrates (De Smet *et al.*, 2003). L'ABA est aussi connu pour inhiber la germination des graines. Cependant, l'inhibition de la formation des racines latérales est dix fois plus sensible à l'ABA que ne l'est l'inhibition de la germination. De plus, des mutants devenus insensibles à l'action de l'ABA en ce qui concerne la germination, ne le sont pas pour ce qui est de l'inhibition de la formation des racines latérales (De Smet *et al.*, 2003). Enfin, des études morphologiques ont montré que l'ABA inhibait la formation des racines latérales en agissant entre les stades III et V du développement du primordium de la racine latérale (Casimiro *et al.*, 2003).

2.4 Mécanismes morphologiques et physiologiques de la tubérisation

Une jeune racine principale, non tubérisée, possède encore la fonction d'organe-source. Elle est toujours le lieu d'absorption des éléments minéraux du sol ainsi que celui de la synthèse d'hormones (cytokinines, gibbérellines, ABA). La tubérisation est le mécanisme qui permet une croissance radiale importante de la racine principale, appelée racine pivot. Cette tubérisation est initiée par une forte activité des méristèmes secondaires : cambium

libero-ligneux et cambium subéro-phellodermique. La première assise engendre respectivement, le xylème secondaire vers l'intérieur (ou bois) et le phloème secondaire vers l'extérieur (ou liber). La seconde donne naissance au phelloderme (vers l'intérieur) et au suber (vers l'extérieur). Cette croissance radiale est souvent accompagnée d'une réorientation métabolique permettant à la racine tubérisée de devenir un organe-puits stockant des réserves sous forme de dérivés sucrés, comme chez la chicorée, la carotte, la betterave, le radis ou le dahlia par exemple.

2.4.1 Structure et fonction du cambium libero-ligneux

Le cambium libero-ligneux joue un très grand rôle dans la croissance en épaisseur des tiges et des racines des Angiospermes Dicotylédones et des Gymnospermes. Il constitue un méristème secondaire placé entre le xylème primaire et le phloème primaire. Il est engendré par les cellules du procambium.

Historiquement, le mot cambium a été employé pour la première fois par Grew en 1682. Cependant, jusqu'à la moitié du 19^{ième} siècle, le cambium était présenté comme un liquide de nutrition situé entre le liber et le bois. De Mirbel (1828) a été le premier à avancer que le cambium n'était pas un liquide, mais un tissu dont la partie externe produisait le liber et dont la partie interne donnait naissance au bois. Cette analyse, pourtant vraie, fut contestée par de nombreux auteurs (pour review : Larson, 1994). Si maintenant l'organisation tissulaire du cambium libero-ligneux a été largement étudiée et démontrée, il existe toujours un point de divergence quant au nombre de files cellulaires composant ce cambium libero-ligneux. En 1853, Hartig fait état d'un cambium libero-ligneux composé de deux couches de cellules dont la plus externe donne le liber et la plus interne le bois. A l'opposé, Raatz (1892) a considéré le cambium comme étant composé de plusieurs couches de cellules. En fait, depuis les travaux de Sanio (1873) sur le pin sylvestre, le cambium est généralement présenté comme une monocouche cellulaire. Les cellules du cambium se divisent pour donner, d'une part une cellule mère du bois ou du liber et d'autre part, une cellule gardant les caractéristiques des cellules cambiales. Les cellules mères du bois et du liber peuvent ensuite se diviser plusieurs fois avant que n'ait lieu la différenciation centripète du xylème secondaire et centrifuge du phloème secondaire (figure 8). A l'heure actuelle, la difficulté rencontrée quant à la détermination de la différence entre les cellules mères et les cellules cambiales amène les auteurs à parler de zone cambiale comprenant les cellules du cambium, ainsi que les cellules

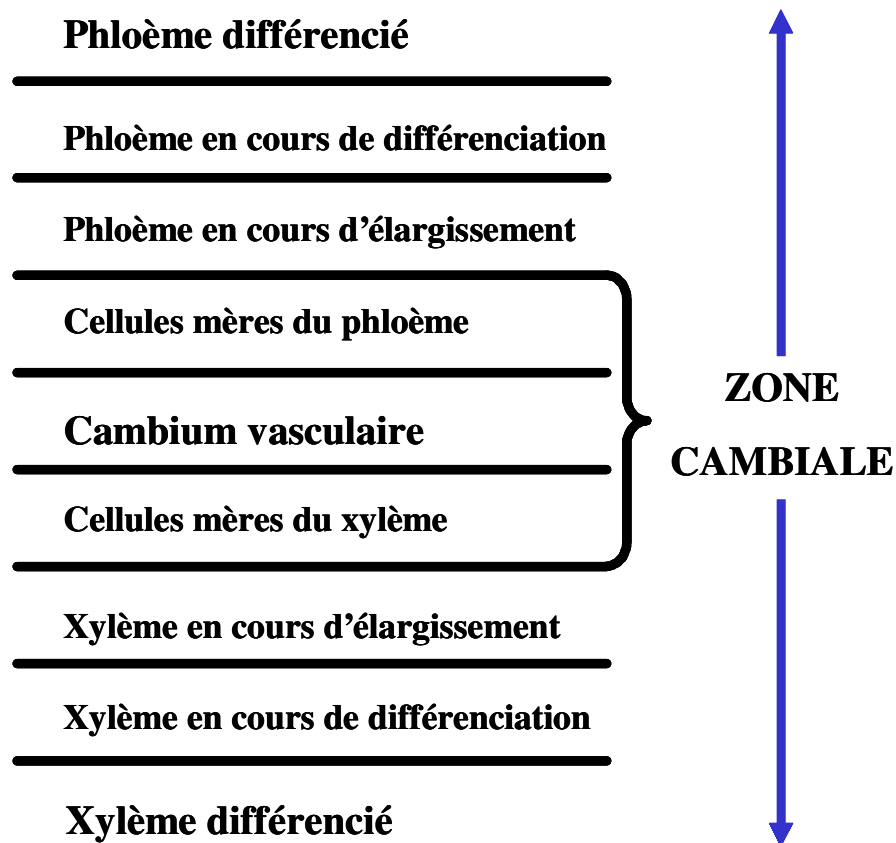


Figure 8 : Représentation schématique de l'organisation de la zone cambiale et de la production des tissus conducteurs secondaires. Le sens de différenciation des tissus secondaires est représenté par les flèches bleues.

mères du bois et du liber. Chaffey *et al.* (1997) ont montré que les cambiums vasculaires observés dans les tiges et les racines étaient complètement similaires.

Le cambium libero-ligneux est composé de deux types de cellules. Les initiales courtes, appelées aussi initiales des rayons, produisent les rayons libéroligneux. Les initiales fusiformes produisent vers l'intérieur les éléments du bois (vaisseaux, parenchyme xylémien et fibres chez les Angiospermes Dicotylédones et trachéides chez les Gymnospermes) et vers l'extérieur les éléments du liber (tubes criblés, cellules compagnes et parenchyme phloémien) (Lachaud *et al.*, 1999). Le rapport entre le nombre de cellules fusiformes et le nombre de cellules initiales des rayons varie en fonction de l'âge du cambium, mais aussi en fonction de l'espèce étudiée. Ce rapport peut varier de 25% chez certaines espèces tropicales à 100% chez le bougainvillier. L'absence complète d'initiales de rayons est assez surprenante, car ces rayons jouent un grand rôle dans le transport horizontal de la sève entre le bois et le liber (Lachaud *et al.*, 1999). Le rapport entre les deux types cellulaires peut être modifié d'une part, par des divisions périclines des cellules allongées fusiformes pour donner deux cellules initiales des rayons et d'autre part, par l'élongation d'une cellule initiale des rayons pour donner une cellule fusiforme.

La forme et la taille des noyaux des cellules initiales des rayons et des cellules fusiformes sont différentes. Les cellules initiales des rayons présentent des noyaux ronds avec un ou deux nucléoles, alors que les cellules fusiformes possèdent des noyaux ovoïdes et allongés avec de nombreux nucléoles alignés. Ces derniers noyaux grossissent avec l'âge de la plante (Lachaud *et al.*, 1999).

2.4.2 Régulation de l'activité du cambium libero-ligneux

Différentes expériences de décapitation des bourgeons ou des feuilles, d'application d'inhibiteurs du transport ou de la synthèse des hormones ainsi que de mesure des quantités d'hormones ont permis d'avancer dans la compréhension des mécanismes de régulation de l'activité du cambium libero-ligneux. Il est acquis maintenant que l'acide indole-3-acétique (AIA) joue un rôle central dans cette régulation. Cette hormone est essentielle à l'initiation du procambium, à la division des cellules cambiales ainsi qu'à la formation de la paroi primaire pecto-cellulosique (Aloni, 1995 ; Little et Pharris, 1995). L'AIA permet aussi d'éviter les divisions transversales des cellules fusiformes donnant naissance aux cellules des rayons (Cui *et al.*, 1996). De plus, la comparaison des quantités d'AIA dans les tissus montre un pic dans les cellules cambiales (Ugla *et al.*, 1998). Enfin, l'action de l'AIA sur l'activité du cambium

libero-ligneux a été stimulée par l'ajout de gibbérellines (Wang *et al.*, 1997), de cytokinines (Moritz et Sundberg, 1996) et d'éthylène (Eklund and Little, 1996). Par contre l'acide abscissique inhibe cette action (Little et Pharris, 1995).

Contrairement aux actions des hormones végétales, assez largement étudiées, peu de gènes spécifiques de l'activité cambiale, ont été isolés et caractérisés. Les gènes homéobox (HB; contenant une courte séquence d'ADN retrouvée dans des gènes ayant en commun la propriété de moduler l'activité d'autres ensembles de gènes au cours du développement embryonnaire) codant pour un homéodomaine (HD) semblent jouer un grand rôle dans les processus du développement, dans le devenir cellulaire et dans la différenciation cellulaire. Des gènes *HB* ont été isolés à partir de la région cambiale d'un hybride de peuplier (*Populus tremula* x *P. tremuloides* Michx.). Ils font partie d'une nouvelle classe de gènes, appelée PALE, jamais décrite auparavant dans aucun système (Hertzberg et Olsson, 1998). L'expression de deux membres de cette classe (*PttHB1* et *PttHB2*) a été étudiée en détail. Le gène *PttHB1* s'exprime juste au début de la formation de la paroi secondaire des vaisseaux de xylème, alors que le gène *PttHB2* s'exprime dans le phloème en différenciation, le cambium libero-ligneux et le xylème en différenciation. Un autre gène *HB* a été étudié chez *Arabidopsis*. Le gène *AtHB8* est exprimé de manière préférentielle dans les cellules du procambium, indiquant ainsi son rôle dans l'activité de ces cellules et dans le développement du système vasculaire (Baima *et al.*, 2001). Des *A. thaliana* et des tabacs surexprimant ce gène ont été étudiés et montrent que, chez *A. thaliana*, le diamètre des vaisseaux de xylème était plus important chez le mutant, et que chez le tabac, le nombre de cellules du xylème secondaire par file radiale de cellules est plus grand chez le mutant. Ces observations montrent que le gène *AtHB8* intervient au niveau de la différenciation des cellules-filles du cambium libero-ligneux en xylème secondaire (Baima *et al.*, 2001).

Sterky *et al.* (1998) ont réalisé, sur deux hybrides de peuplier, deux banques d'ESTs (expressed sequence tag) issues de tiges et construites, l'une à partir d'une région cambiale (cambium libero-ligneux, xylème secondaire en développement et phloème secondaire) et, l'autre à partir du xylème en développement. Ils ont pu en déduire la présence dans ces banques de 820 séquences codant des protéines connues. Ces protéines ont été classées en 12 groupes différents (protéines de liaison à l'ADN, hormones, synthèse protéique, protéines modifiées, synthèse de nucléotides, parois cellulaires, stress, cytosquelette, cycle cellulaire, protéines de signal, métabolismes et autres protéines). Ils ont pu observer que la plus grande différence entre les deux banques était la présence deux fois plus importante de gènes responsables de la formation des parois végétales dans la banque de xylème en

développement. Les cellules du xylème secondaire en cours de différenciation ont ainsi besoin de la production de protéines impliquées dans la synthèse de lignine qui est le composé le plus abondant des parois de ces cellules.

Les gènes marqueurs du cycle cellulaire sont aussi de bons moyens d'étude de la régulation de l'activité du cambium libero-ligneux, mais à l'heure actuelle peu de travaux relatent de l'expression de ces gènes lors de la division des cellules cambiales. Il est à noter que des gènes tels que des CDKs (cyclin dependant kinases), des cyclines mitotiques ou des ubiquitine-like ont été isolés dans des banques ESTs de la région cambiale du peuplier (Sterky *et al.*, 1998).

2.4.3 Réorientation métabolique au cours de la tubérisation

La tubérisation est souvent couplée à une réorientation métabolique. Ce dernier aspect a été étudié chez quelques plantes comme *Daucus carota*, *Taraxacum officinale* et *Cichorium intybus*. Chez *D. carota*, les concentrations en glucose et en saccharose sont deux à trois fois plus importantes dans les cellules situées à proximité du cambium libero-ligneux que dans la moëlle ou le périoderme (ensemble suber, cambium subéro-phellodermique et phelloderme ; Korolev *et al.*, 2000). Les plus fortes concentrations en sucres ont été mises en évidence dans les cellules des parenchymes xylémien et phloémien secondaires, qui sont des parenchymes de réserve. En même temps, les concentrations en ions tels que le potassium, sont plus importantes dans la moëlle et dans le périoderme. Les cellules du cambium libero-ligneux présentent quant à elles, des faibles concentrations aussi bien en sucres qu'en ions. Des plantes de la famille des Astéracées, telles que *T. officinale* ou *C. intybus*, stockent des dérivés sucrés sous forme de polymères de fructosanes. L'enzyme clef de la synthèse de ces dérivés est la saccharose:saccharose 1-fructosyltransférase (1-SST). Van den Ende *et al.* (2000) ont montré que chez *T. officinale*, l'expression de la 1-SST était importante dans les racines et faible dans les feuilles. Au cours de la tubérisation de la racine, le taux d'ARNm 1-SST ainsi que l'activité de l'enzyme sont plus forts dans le phloème secondaire résultant en une plus grande quantité de fructosanes dans ce tissu. Ces dérivés sucrés sont stockés préférentiellement dans les cellules du parenchyme phloémien secondaire. Chez *C. intybus*, une augmentation des activités de la 1-SST et de la fructosane:fructosane 1-fructosyl transférase (1-FFT) se produit dans les racines lors de la mise en place des tissus secondaires, entraînant du même fait une synthèse accrue de l'inuline dans ces tissus (Druart *et al.*, 2001). Dans le même temps, l'activité d'une des enzymes responsables de l'assimilation du nitrate, la

nitrate réductase, diminue fortement dans la racine lorsque la plante débute son processus de tubérisation (Druart *et al.*, 2000).

III) Le cycle cellulaire des plantes supérieures

Depuis les travaux sur le pois (Howard et Pelc, 1953), le cycle cellulaire a pu être défini par quatre phases successives appelées G1, S, G2 et M (figure 9). La division d'une cellule passe par les phases de réplication de l'ADN (phase S), de division nucléaire et cytotodière (mitose ou phase M), intercalées avec les phases G1 et G2 (G pour «GAP» : intervalle) pendant lesquelles la cellule croît et prépare sa division.

La progression du cycle cellulaire est régulée au niveau de deux points :

- Le premier, situé au niveau de la transition G1/S, est connu sous le nom de point de restriction (R) chez les mammifères ou de START chez les levures. A ce niveau, la cellule décide de continuer sa progression dans le cycle cellulaire ou d'en sortir afin de se différencier.
- Le second point de régulation apparaît lors de la transition G2/M et permet à la cellule de contrôler si elle est capable ou non de se diviser : la réplication de l'ADN doit être achevée afin qu'il puisse être réparti dans les deux cellules -filles. Les événements qui se produisent à ce niveau définissent la transition G2/M.

Au cours de l'évolution, les mécanismes principaux de contrôle du cycle cellulaire ont été fortement conservés chez tous les eucaryotes. La progression à travers le cycle est contrôlé par des hétérodimères Ser/Thr protéines kinases. Ces dimères sont composés d'une sous-unité catalytique, la kinase dépendante des cyclines ou CDK (cyclin-dependent kinase), et d'une sous-unité régulatrice, la cycline. Si la plupart des protéines contrôlant le cycle cellulaire a été découverte chez les levures ou les animaux, elles ont été aussi retrouvées chez les plantes (Mironov *et al.*, 1999).

1. Facteurs moléculaires contrôlant la division cellulaire

1.1 Les kinases dépendantes des cyclines ou CDKs

L'étude de la séquence génomique complète d'*A. thaliana* a permis de mettre en évidence l'existence de 12 gènes codant des CDKs. Ils ont été classés en dix grands groupes (A1, B1, B2, C1, C2, D1, D2, D3, E1, F1) sur la base de leurs séquences protéiques

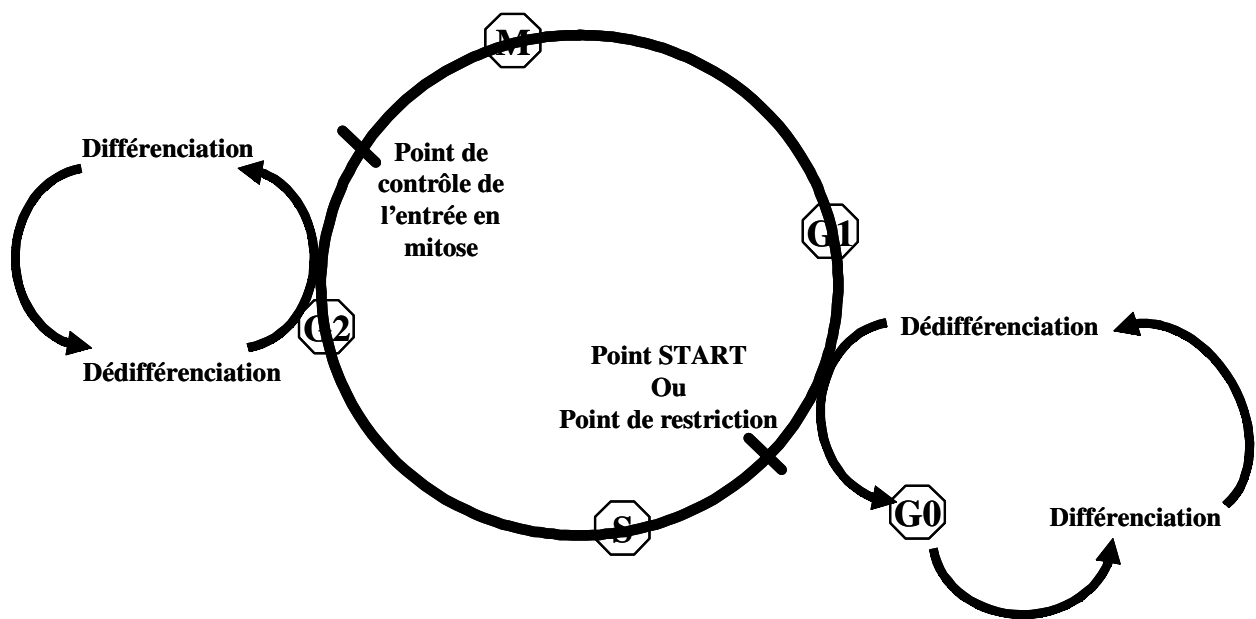


Figure 9 : Représentation schématique du cycle cellulaire chez les plantes supérieures. Les cellules en division passent par les phases successives G1, S=duplication de l'ADN, G2 et M=mitose. Les cellules peuvent sortir du cycle cellulaire aussi bien lors de la transition G1/S pour passer en phase G0, et lors de la transition G2/M, afin de subir des événements de différenciation/dédifférenciation.

(Vandepoele *et al.*, 2002; figure 10). Des kinases homologues ont été isolées chez d'autres espèces (*Medicago sativa*, *Nicotiana tabacum*, *Glycine max*, *Zea mays*,...). Les CDKs les plus étudiées sont les CDKs de type A. Ces protéines présentent des homologies importantes avec les groupes de CDKs cdc2/CDC28 chez la levure et les CDK1 et CDK2 chez les animaux. Toutes ces protéines kinases possèdent un motif PSTAIRE, situé au niveau d'un domaine de 16 acides aminés, dans la région de liaison aux cyclines. Parmi ces kinases, nous pouvons citer la cdc2a d'*A. thaliana* (At;CDKA;1), les cdc2a et cdc2b de *Medicago sativa* (Ms;CDKA;1 et Ms;CDKA;2) ainsi que la cdc2a de *Zea mays* (Zm;CDKA;1). Ces kinases sont exprimées dans les cellules en division, mais aussi dans les cellules qui présentent la capacité à se diviser. Les activités les plus élevées de phosphorylation de l'histone H1 par ces kinases sont retrouvées lors des phases S, G2 et M du cycle cellulaire. Cependant, l'observation de l'accumulation des transcrits cdc2aAt montrent une expression complètement indépendante des phases du cycle cellulaire, ce qui est typique de la majorité des CDKs de type A (Mironov *et al.*, 1999). Cette expression constante est de plus suivie par une quantité constante en protéines au cours du cycle cellulaire. La régulation de l'activité de cdc2aAt semble donc être de nature post-traductionnelle en réponse à des stimuli environnementaux.

Les CDKs de type B sont divisées en deux sous-groupes, basés sur leurs séquences en acides aminés (Joubès *et al.*, 2000). Elles possèdent au niveau de leur site de liaison aux cyclines des motifs différents. Par exemple, la kinase CDKB1;1 d'*A. thaliana* présente un motif PPTALRE et fait partie du premier sous-groupe, alors que la kinase CDKB2;1 de *M. sativa* présente un motif PPTTLRE et fait partie du deuxième sous-groupe. Ces kinases ne possèdent pas d'homologies de séquences avec les cdc2/CDC28 de levure. Leur expression n'a été mise en évidence que dans les cellules en division. Elles sont les seules à être fortement régulées de manière transcriptionnelle (Sorrell *et al.*, 2001). Les transcrits de ces kinases s'accumulent préférentiellement entre les phases S et G2 et entre les phases G2 et M. Les quantités de protéines n'ont été étudiées que chez *Medicago sativa*. Ces quantités varient au cours du cycle cellulaire et sont maximales au moment de la phase M. Cette accumulation de protéines est aisément corrélée à une activité élevée de phosphorylation *in vitro* de l'histone H1 au cours de la transition G2/M (Magyar *et al.*, 1997).

Les CDKs de type C possèdent des motifs PITAIRE ou SPTAIRE. Chez *A. thaliana*, deux CDKs de types C, les CDKC;1 et CDKC;2 ont été étudiées (Barrôco *et al.*, 2003). Des techniques de double hybrides ont montré que ces CDKs n'interagissent pas avec des cyclines G1 ou mitotiques. A ce titre, elles ne joueraient donc pas de rôle dans le contrôle du cycle cellulaire dans les cellules mitotiquement actives. Dans les racines, les transcrits CDKs C ont

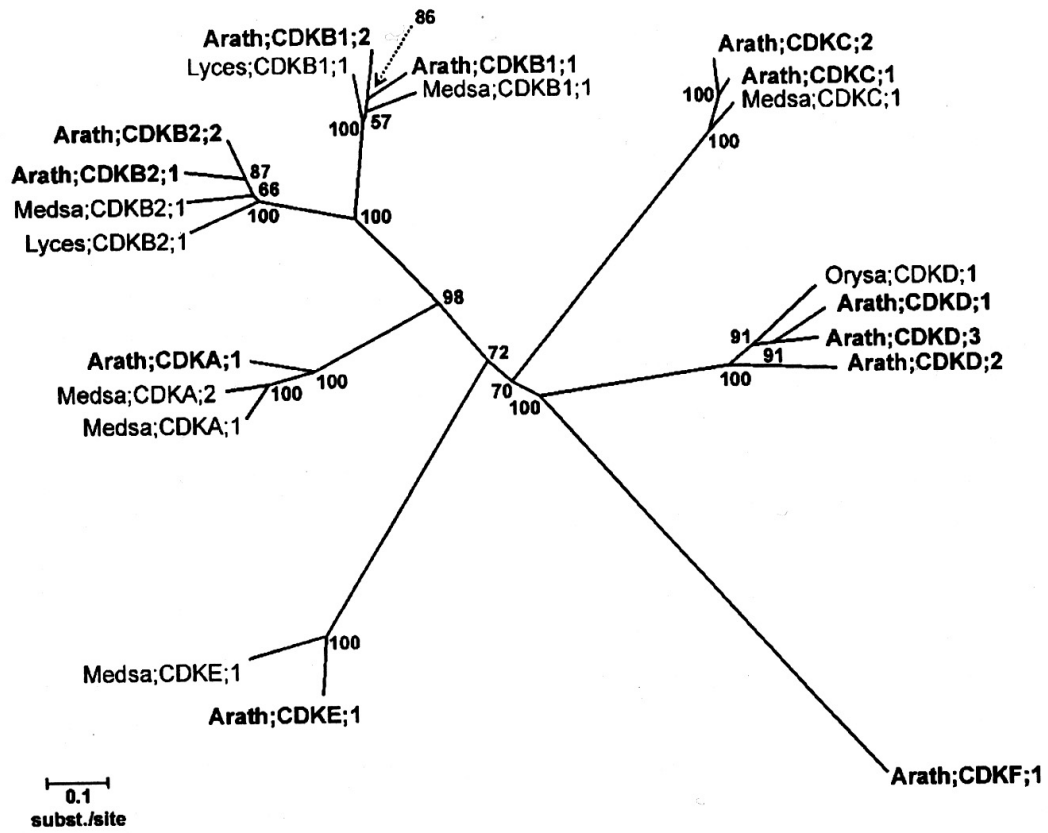


Figure 10 : Arbre phylogénétique des kinases dépendantes des cyclines de classe A, B, C, D, E et F de quelques espèces végétales. Arath: *A. thaliana*; Lyces: *Lycopersicon esculentum*; Medsa: *Medicago sativa*; Orysa: *Oryza sativa*. D'après Vandepoele *et al.*, 2002

été retrouvés au niveau de l'endoderme (tissu hautement différencié), ce qui semble montrer une implication de ces CDKs dans des cellules totalement différenciées. Ces CDKs présentent des homologies avec la CDK9 des animaux. Elles interagissent avec des protéines homologues aux cyclines T et cyclines K des animaux. Chez les animaux, les complexes CDK9/CycT sont responsables de la machinerie de transcription. Les CDKs C d'*A. thaliana* feraient donc partie d'un complexe jouant un rôle probable lors de la régulation de la transcription au niveau des cellules différenciées.

Les CDKs de type D représentent les CAK (**C**DKs **a**ctivating **k**inase). Chez le riz, un gène codant une CAK a été isolé (Umeda *et al.*, 1998), et nommé CDKD;1. Basée sur des homologies de séquences avec la CDKD;1 du riz, l'étude du génome d'*A. thaliana* a mis en évidence trois gènes, CDKD;1, CDKD;2 et CDKD;3, codant pour une classe de CAKs (Vandepoele *et al.*, 2002).

Il existe enfin deux autres classes de CDKs, les CDK E et CDK F. Deux gènes de CDK E ont été identifiés, l'un chez *M. sativa* (CDKE;1), l'autre chez *A. thaliana* (CDKE;1, d'après des homologies de séquences avec la CDKE;1 de *M. sativa*). La CDKE;1 de *M. sativa* possède des homologies de séquence avec la CDK8 humaine qui intervient dans la régulation de l'ARN polymérase II (Joubès *et al.*, 2000). Enfin, un membre de la classe des CDKs F a été retrouvé chez *A. thaliana*. La CDKF;1 est en fait la CAK1At. Cette CAK a été classée indépendamment des CDKs de type D, du fait de sa différence de séquence par rapport aux CDKs D d'*A. thaliana* (Vandepoele *et al.*, 2002).

1.2 Les cyclines, sous-unités régulatrices des complexes CDK/Cycline

Dans tous les systèmes eucaryotes, les cyclines sont assez fortement conservées. C'est grâce à ces homologies importantes que ces protéines ont été caractérisées de manière étendue chez les plantes. Les cyclines sont essentielles pour l'activation des CDKs et sont donc à ce titre la première cible de régulation lors des événements qui impliquent les gènes responsables du contrôle du cycle cellulaire.

Chez les levures et les mammifères, de nombreuses cyclines ont été isolées et séparées en deux groupes en se basant sur des similitudes de séquence et de fonction (Pines, 1996). Les premières, les cyclines de type G1, jouent un rôle élémentaire durant la phase G1 et lors de la transition G1/S (Stern et Nurse, 1996). Les secondes, les cyclines mitotiques, sont essentielles pour la progression en phase G2 et l'entrée en phase M.

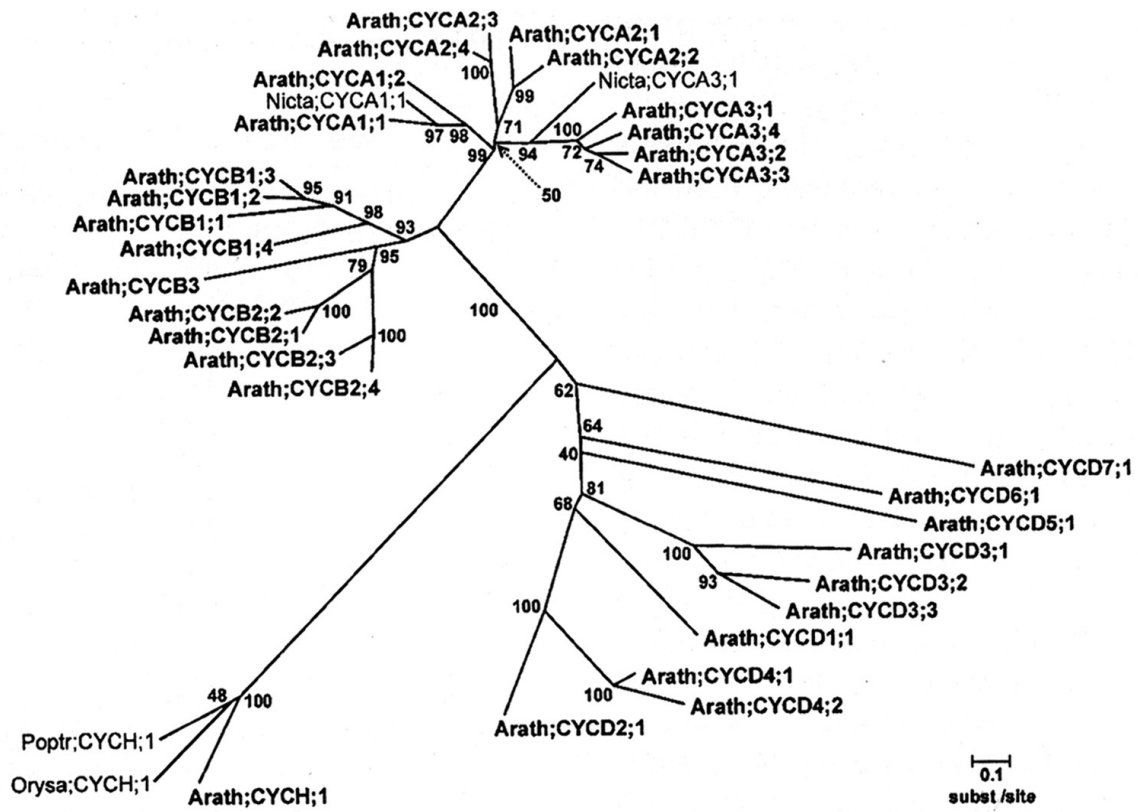


Figure 11 : Arbre phylogénétique des groupes A, B, D et H de cyclines végétales. Arath: *A. thaliana*; Nicta: *Nicotiana tabacum*; Orysa: *Oryza sativa*; Poptr: *Populus tremula* X *Populus tremuloides*. D'après Vandepoele *et al.*, 2002.

Chez les végétaux, de nombreux ADNc codant des cyclines putatives ont été isolés et caractérisés chez plusieurs espèces (Renaudin *et al.*, 1996). Toutes ces cyclines possèdent une séquence d'acides aminés hautement conservée d'une cycline à l'autre et d'un individu à l'autre. Cette séquence correspond au site de liaison à une CDK et est appelée « boîte cycline ». L'analyse de la séquence peptidique déduite au niveau de cette boîte ainsi que l'étude exhaustive du génome complet d'*A. thaliana* ont permis d'identifier 30 gènes de cyclines regroupés en 14 classes : A1, A2, A3, B1, B2, B3, D1, D2, D3, D4, D5, D6, D7 et H (Vandepoele *et al.*, 2002; figure 11). Plus récemment, des travaux de Barrôco *et al.* (2003), évoquent la présence chez *A. thaliana* d'une cycline de type T qui présente des homologies de séquences avec les cyclines T animales. Ces cyclines font partie d'un complexe essentiel à la régulation de la transcription.

1.2.1 Les cyclines de type D

Les cyclines de type D sont connues pour jouer un grand rôle dans la régulation du cycle cellulaire en réponse à des stimuli extérieurs. Ces cyclines ont été isolées et classées en fonction de leur capacité à restaurer le cycle cellulaire dans des mutants de levures présentant un défaut dans l'activité des cyclines de type G1. Chez *A. thaliana*, sept groupes de cyclines D (CycD1, CycD2, CycD3, CycD4, CycD5, CycD6 et CycD7) ont ainsi pu être mis en évidence (Vandepoele *et al.*, 2002). Seules les cyclines D1, D2, D3 et D4 ont été caractérisées expérimentalement. L'homologie de séquences entre ces cyclines et leurs homologues chez les animaux et levures reste très faible, comprise entre 9 et 14%. Cependant, elles possèdent comme chez les animaux, un motif de liaison LxCxE (ou x est un acide aminé quelconque ; L=leucine, C=cystéine, E=acide glutamique) à la protéine du rétinoblastome (Rb), à l'exception, chez *A. thaliana*, de CycD4;2 et CycD6;1 qui n'ont aucun domaine de liaison et de CycD5;1 qui présente un domaine FxCxE (Vandepoele *et al.*, 2002). Chez les animaux, la phosphorylation de la protéine Rb par le complexe CycD/CDK est requis pour la sortie de la phase G1 et la progression en phase S. Dans le groupe CycD1, la leucine du motif LxCxE est toujours précédée par un résidu acide, ce qui n'est pas le cas dans les groupes CycD2 et CycD3. Ces différences suggèrent l'existence de multiples protéines du rétinoblastome chez les plantes, reconnues par les cyclines D de différents groupes.

De nombreux mécanismes de contrôle transcriptionnels et post-traductionnels de l'activité de ces cyclines ont été décrits chez les végétaux. Le saccharose semble contrôler l'activité des cyclines de type D (Riou-Khamlichi *et al.*, 2000). Les cyclines du groupe D3

semblent jouer un rôle important dans la régulation du cycle cellulaire via les hormones végétales. En effet, la transcription du gène *cycD3,1* est régulée par les cytokinines (Riou-Khamlichi *et al.*, 1999), ainsi que par les brassinostéroïdes (Hu *et al.*, 2000).

1.2.2 Les cyclines mitotiques de type A et de type B

Les cyclines des classes A et B de plantes possèdent une organisation structurale définie chez les cyclines A et B des autres eucaryotes (Renaudin *et al.*, 1996). Elles présentent toutes une boîte cycline très conservée. Une seule séquence située dans l'hélice H1 de cette boîte permet de séparer sans ambiguïté les cyclines de type A des cyclines de type B. En effet, les cyclines de type B possèdent à cet endroit un motif HxKF (H=Histidine, K=Lysine, F=Phénylalanine). Toutes les cyclines de type A possèdent une séquence peptidique conservée LVEVxEEY (L=leucine, V=valine, E=acide glutamique et Y=tryptophane), alors que les cyclines de type B présentent une séquence (H/Q)x5K/R/L(F/L) (H=histidine, Q=glutamine, K=lysine, R=arginine, L=leucine et F=phénylalanine). Par ailleurs, chez les plantes, les cyclines de types A et B présentent une région variable d'environ 180 acides aminés situés dans le domaine N-terminal. Au niveau de cette région, il existe différents motifs conservés. Le premier, long de neuf acides aminés est décrit chez les animaux et les levures comme étant une « boîte de destruction », dont le premier résidu, une arginine, semble essentiel (Glotzer *et al.*, 1991). On peut toutefois noter que chaque type de cyclines A ou B possède des séquences consensus différentes pour cette région, ce qui pourrait refléter l'existence de plusieurs systèmes de dégradation de ces cyclines. D'autres motifs ont pu être mis en évidence dans cette région variable. L'exemple le plus frappant est trouvé chez les cyclines de type B1. Elles possèdent une séquence conservée de six acides aminés (soulignés) au sein du motif TS(V/T)LTARSKAAC.

Chez les mammifères, une seule cycline A et deux cyclines B ont été identifiées et sont suffisantes pour contrôler l'activité des CDKs entre les phases S et M. Chez les végétaux, plusieurs types de cyclines A ont été isolés et regroupés en trois sous-groupes : A1, A2 et A3 (Vandepoele *et al.*, 2002). Cependant même si ces cyclines ont été classées, leurs régulations et leurs modes d'action restent mal connus à l'heure actuelle. Des expériences d'hybridation *in situ* réalisées sur des cellules d'*A. thaliana* arrêtées au niveau de la transition G1/S par l'hydroxyurée ou au niveau de la métaphase par l'oryzaline, semblent montrer que les cyclines *CycA2;1* et *CycA2;2* seraient exprimées entre le début de la phase S et la fin de la phase G2 (Burssens *et al.*, 2000). Dans des cellules BY2 de tabac contenant le gène

rapporteur *uidA* sous le contrôle du promoteur de *At;cycA2;1*, il est observé une augmentation des transcrits pendant la phase S et jusqu'à la fin de la phase G2 (Shaul *et al.*, 1996).

Les cyclines de type B ont été classées en trois groupes B1, B2 et B3, en fonction de leurs homologies de séquences avec les cyclines B des animaux et des levures (Vandepoele *et al.*, 2002). Des expériences de blocage du cycle cellulaire par des inhibiteurs, similaires à celles faites sur les cyclines de type A, ont montré que les cyclines de type B étaient exprimées de manière spécifique lors de la transition entre les phases G2 et M (Ferreira *et al.*, 1994, Hemerly *et al.*, 1992). De plus, les différentes expériences réalisées chez *A. thaliana* et sur des cellules BY2 de tabac ont toutes corrélé l'expression de cyclines de type B exclusivement avec des cellules en division. Cependant, récemment, Boucheron *et al.* (2002) ont mis en évidence un activité de la β -glucuronidase dans des plantes de tabacs contenant le gène *uidA*, sous le contrôle du promoteur de *cycB1,1* d'*Arabidopsis thaliana*, au niveau de cellules du phloème interne de tige qui ne subissent pas de divisions, mais qui pourraient avoir acquis la compétence à se diviser.

La présence de plusieurs cyclines dans un même groupe pose la question de l'expression spécifique de ces cyclines dans un ou plusieurs tissus. Chez le lupin par exemple, quatre cyclines de type B1 (*CycB1;1*, *CycB1;2*, *CycB1;3* et *CycB1;4*) ont été isolées à partir de banques d'ADNc issues de nodules en développement et de racines traitées par des phytohormones. L'expression de ces quatre membres a été étudiée dans les différents tissus lors de la formation des nodules racinaires. Même si les quatre cyclines sont exprimées durant la formation des nodules, les auteurs ont constaté que *CycB1;3* et *CycB1;4* étaient exprimées durant les phases précoces de la nodulation, alors que les transcrits *CycB1;1* et *CycB1;2* étaient présents lors des événements tardifs. De plus, *CycB1;1* et *CycB1;4* sont exprimés dans les méristèmes racinaires, caulinaires et floraux (Jelenska *et al.*, 2000). Les cyclines mitotiques d'un même type interviendraient de manière spécifique d'une part, en fonction de l'organe et d'autre part, en fonction du stade de développement étudié.

2. La régulation du cycle cellulaire chez les plantes supérieures

2.1 L'entrée en G1 et la transition G1/S

Chez les animaux et les levures, le mécanisme général de contrôle de la transition G1/S est assez bien connu. Au niveau du point START chez les levures ou de Restriction chez les animaux, les cellules choisissent entre la poursuite du cycle cellulaire et la différenciation.

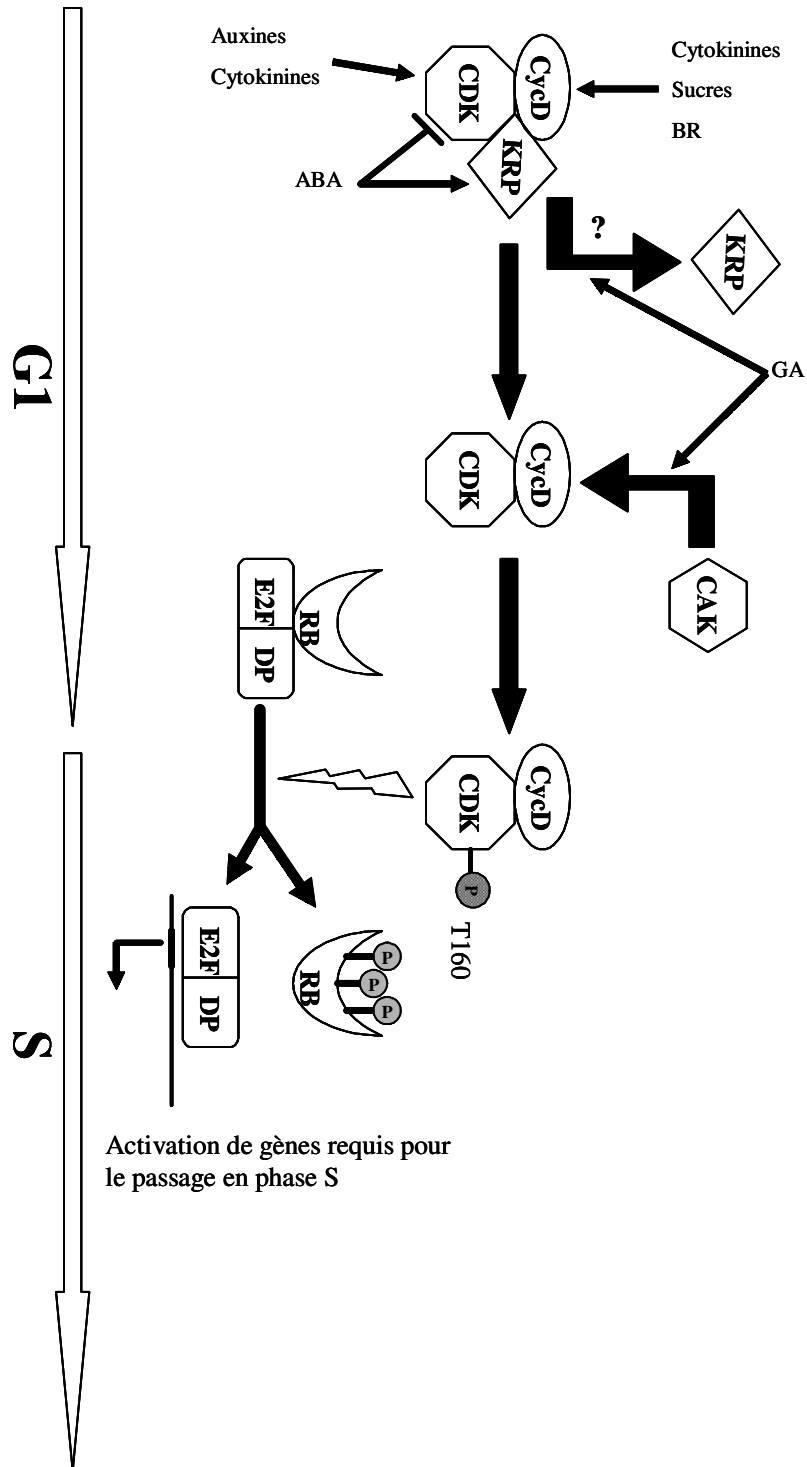


Figure 12 : Modèle de régulation de la transition G1/S chez les plantes. T160: phosphorylation de la thréonine 160. Les complexes CDK/cycline sont inactivés par la liaison à une protéine KRP. L'activation de ce complexe demande le décrochage de la protéine KRP ainsi que la phosphorylation du résidu T160 de la CDK par une CAK. Le complexe CDK/cycline actif phosphoryle la protéine du rétinoblastome, libérant ainsi le facteur de transcription E2F qui va activer les gènes requis pour le passage en phase S.

En réponse à des stimuli environnementaux et par l'intermédiaire de facteurs de croissance, la transcription des gènes codant des cyclines D est mise en route. Ces cyclines s'associent avec des CDK4 ou des CDK6. Les complexes ainsi formés sont activés par phosphorylation par une kinase activatrice des CDKs (CAK) afin de phosphoryler une protéine du rétinoblastome (Rb). La phosphorylation de cette dernière a pour conséquence la libération du facteur de transcription E2F, lié à la protéine de dimérisation DP, et donc l'activation de la transcription des gènes responsables du passage en phase S (figure 12).

Chez les plantes, aucune CDK homologue aux CDKs 4 et 6 des animaux n'a été mise en évidence. Lors de la phase G1, seule la kinase CDKA;1, homologue de la CDK1 des animaux, est exprimée et est capable de se lier aux cyclines de type A2;1, D2;1 et D3;1 (Healy *et al.*, 2001; Roudier *et al.*, 2000). De plus le complexe CDKA;1/CycD3;1 de tabac est capable *in vitro* de phosphoryler une protéine Rb-like de tabac (Nakagami *et al.*, 1999). Les protéines Rb-like ont été caractérisées chez plusieurs espèces végétales telles que le maïs, le tabac, *A. thaliana*, le peuplier et *Chenopodium rubrum*. Mieux encore, la protéine Rb isolée chez le maïs (Zeama ;RB1) et la protéine Rb humaine sont capables de se lier *in vitro* à toutes les classes de cyclines D de plantes (Huntley *et al.*, 1998).

L'activité des complexes CDK/CyclineD est inhibée par l'action de protéines inhibitrices des CDKs (ICK) ou KRP (Kip/Cip Related Protein). Chez *Arabidopsis*, sept gènes codant des KRPs, nommés KRP1 à KRP7, ont été isolés à partir de banques d'ADNc et caractérisés sur la base d'homologies de séquences avec des protéines p27^{KIP2} (De Veylder *et al.*, 2001). Des études d'interaction entre ces KRPs et des protéines contrôlant le cycle cellulaire ont été réalisées en utilisant la technique du double hybride (Zhou *et al.*, 2002; De Veylder *et al.*, 2001). Les auteurs ont constitué deux groupes de KRPs (A et B) en fonction de leur liaison avec la CDKA;1. Les KRPs 1, 2, 6 et 7 se lient à la CDKA;1 et à trois types de Cyclines D (CycD1, CycD2 et CycD3), alors que les KRPs 4 et 5 ne se lient pas à la CDKA;1. A l'opposé, aucune KRP ne se lie à cycB1;1. Ces résultats montrent que les KRPs permettent de réguler l'activité des CDKs lors de la transition G1/S et n'agiraient pas lors de la transition G2/M (De Veylder *et al.*, 2001).

Afin d'entraîner l'expression de gènes essentiels pour le passage en phase S, le facteur de transcription E2F se lie à l'ADN en formant un hétérodimère avec une protéine de dimérisation DP. La protéine Rb peut se lier à ce complexe afin de l'inhiber. Huntley *et al.* (1998) ont montré que la protéine Rb-like de maïs était capable de se lier aux facteurs de transcription E2F humain et de drosophile et de les inactiver. Des protéines présentant des homologies avec le facteur de transcription E2F ont été isolées chez plusieurs plantes comme

le tabac, la carotte ou *A. thaliana*. Ces travaux ont tendance à montrer l'existence probable d'un complexe E2F-DP chez les plantes, fonctionnant certainement selon un mécanisme similaire à celui des animaux.

2.2 La transition G2/M

Pour terminer le cycle cellulaire, lorsque la cellule est passée par la phase S, elle doit encore subir la mitose ou phase M. Pour permettre la transition G2/M, l'association entre une CDK et une cycline mitotique n'est pas suffisante. Ce complexe doit aussi subir, pour être activé, des événements de phosphorylation et de déphosphorylation (figure 13).

Les complexes CDK/cyclines qui régulent la transition G2/M sont inactivés par phosphorylation de la CDK au niveau des sites thréonine 14 et tyrosine 15. Cette phosphorylation est réalisée par une kinase WEE1. L'analyse complète du génome d'*A. thaliana* montre la présence d'un gène homologue *WEE1* (Vandepoele *et al.*, 2002). Dans le même temps, ce gène a été isolé et caractérisé en utilisant une technique de RT-PCR (Sorrell *et al.*, 2002). Il présente des homologies de séquences avec des gènes *WEE1* animaux. La surexpression de ce gène dans des levures *Saccharomyces pombe* bloque la division cellulaire et entraîne la formation de cellules plus grandes. La protéine WEE1 d'*A. thaliana* serait donc bien essentielle à la division cellulaire. Un gène homologue avait précédemment été isolé à partir de l'endosperme de maïs (Sun *et al.*, 1999a). Il présente, dans le domaine kinase, 65 % d'identité avec le gène WEE1 d'*A. thaliana*. La surexpression de ce gène dans les levures entraîne les mêmes phénotypes qu'avec le gène WEE1 d'*A. thaliana*. L'endosperme de maïs est caractérisé par un niveau important d'endoréplication, consistant en une duplication de l'ADN (phase S du cycle cellulaire) sans qu'il y ait mitose (phase M). La protéine WEE1 de maïs est abondamment retrouvée dans les cellules en division et dans l'endosperme pendant la phase d'endoréplication. Elle pourrait donc être à ce titre un des éléments qui inhibe l'activité mitotique des CDKs.

L'inactivation par phosphorylation des sites Thr14/Tyr15 se fait de manière similaire à la CDK2 humaine. Pour être activée, la CDK2 doit subir une déphosphorylation de ce site. Elle est réalisée par une phosphatase spécifique, la CDC25 (Russo *et al.*, 1996). Elle doit être en même temps phosphorylée sur le site de la thréonine 160 par une CAK. Jusqu'à maintenant aucune protéine homologue de la phosphatase CDC25 n'a été isolée chez les plantes (Stals et Inzé, 2001). L'analyse du génome complet d'*A. thaliana* n'a pas mis en évidence une séquence homologue à la CDC25 (Vandepoele *et al.*, 2002). Cependant la CDC25 de

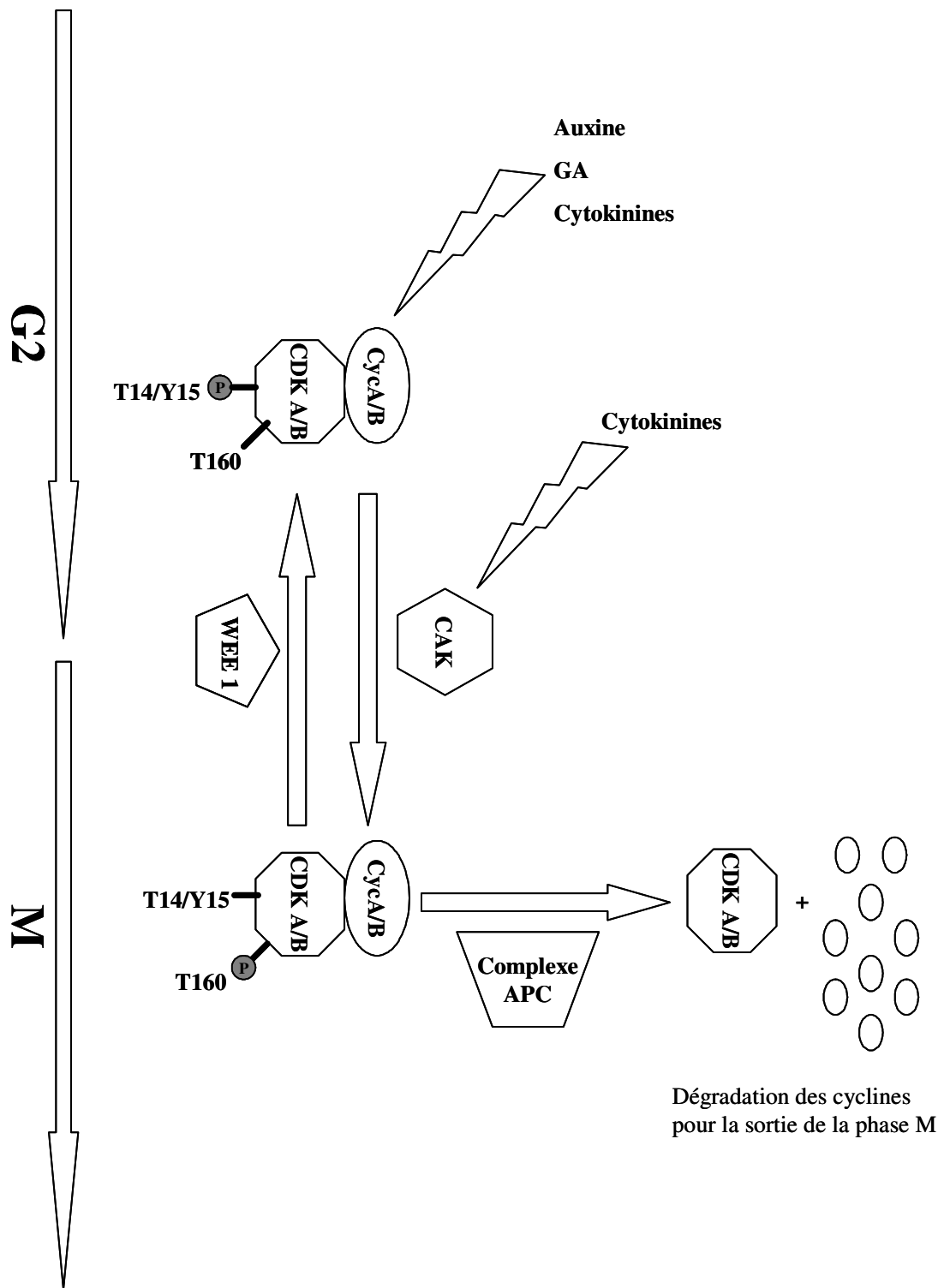


Figure 13 : Modèle de régulation de la transition G2/M chez les plantes. Les complexes CDK/cyclines sont inactivés par la phosphorylation, réalisée par la kinase WEE1, des résidus T14 et Y15. L'activation de ces complexes nécessite la déphosphorylation de ces résidus ainsi que la phosphorylation par une CAK du résidu T160. Les cyclines sont ensuite dégradées par le complexe APC.

drosophile est capable d'augmenter *in vitro* l'activité de la CDKA;1 de *M. sativa* (Mészáros *et al.*, 2000). Une phosphatase, non encore isolée à ce jour, pourrait être responsable de l'activation des complexes CDK/cycline lors de la transition G2/M. Par contre, la phosphorylation de la Thr 160 est réalisée par une kinase activatrice des CDKs (CAK). Chez les plantes, deux CAKs ont été isolées chez le riz et chez *Arabidopsis* et ont été nommées CDKD;1. La CDKD;1 du riz est capable de phosphoryler *in vitro* aussi bien la CDK2 humaine et la CDKA;1 du riz. Elle est aussi capable, tout comme le complexe CDK7-CycH-Mat1, de phosphoryler la partie C-terminale de nombreuses ARN polymérase II (Yamaguchi *et al.*, 1998). De plus, elle est régulée par une cycline de type H, la cycline CycH;1 du riz (Yamaguchi *et al.*, 2000). Elle pourrait donc jouer à ce titre non seulement un rôle dans la phosphorylation du résidu Thr160 des CDKs, mais aussi au niveau des mécanismes de transcription. L'analyse du génome complet d'*A. thaliana* montre l'existence de trois gènes CDKD;1, CDKD;2 et CDKD;3, homologues à CDKD;1 du riz (Vandepoele *et al.*, 2002). Chez *A. thaliana*, une autre classe de CAKs représentée par la cak1At, récemment renommée CDKF;1 (Vandepoele *et al.*, 2002), a été mise en évidence (Umeda *et al.*, 1998). D'après des analyses phylogénétiques, la CDKF;1 d'*A. thaliana* serait distincte de la CDK7 des métazoaires et pourrait donc représenter un nouveau type de CAK (Umeda *et al.*, 1998). Cette CAK ne phosphoryle *in vitro* que la CDK2 humaine et pas le domaine carboxy-terminal des ARN polymérase II (Umeda *et al.*, 1998). L'existence de deux types de CAKs semble montrer que ces kinases joueraient un rôle lors de phases différentes du cycle cellulaire ou seraient spécifiques d'un type de CDK (Stals et Inzé, 2001).

3. Cycle cellulaire et développement

Contrairement aux animaux, tous les organes d'une plante adulte ne sont pas formés lors de l'embryogenèse. Seul l'axe apico-basal est formé dans l'embryon. A ce stade, l'activité mitotique importante des cellules des méristèmes caulinaires et racinaires permettent la croissance en longueur. Cependant, la plante va continuer à produire de nouveaux organes ou tissus tout au long de sa vie : feuilles, tiges, fleurs, racines latérales, tissus secondaires (bois et liber). Que ce soit lors de la croissance en longueur ou lors de la formation de nouveaux tissus ou organes, la plante a besoin de groupes de cellules mitotiquement actives. Au cours de sa vie, le contrôle du cycle cellulaire est donc un événement essentiel pour le développement correct de la plante. De nombreux gènes contrôlant le cycle cellulaire ont

donc fait l'objet d'études approfondies lors de différentes phases du développement. Quelques exemples relatant ces études seront donnés dans cette partie.

Chez les plantes, les divisions cellulaires sont surtout concentrées au niveau des méristèmes. Le rôle essentiel joué par les divisions dans ces zones au cours du développement a été démontré grâce à l'obtention de mutants. Le mutant « rootmeristemless » (*rml1*) présente des profils axiaux et radiaux normaux, mais il est incapable de garder une zone méristématique indifférenciée au sein de la racine. Cette mutation empêche la division cellulaire au niveau de l'apex racinaire. Les cellules de cette zone sont arrêtées en phase G1 du cycle cellulaire (Vernoux *et al.*, 2000). Le gène *RML1* code la première enzyme de la voie de biosynthèse du glutathion. Les auteurs ont montré que la transition G1/S dans des cellules de tabac en suspension nécessitait la présence de glutathion. Ce dernier aurait donc un rôle important au sein du méristème racinaire pour l'initiation des divisions et le maintien des cellules du méristème racinaire à l'état indifférencié (Vernoux *et al.*, 2000).

De nombreux mutants de l'embryogenèse ont été isolés et étudiés chez *A. thaliana*. Cependant, dans ces mutants, aucun gène marqueur du cycle cellulaire (CDKs, cyclines, KRP, CAK ou WEE1) n'est directement touché. Afin d'étudier le rôle d'une CDK A durant l'embryogenèse, Hemeryly *et al.* (2000) ont étudié les phénotypes de mutants dominants négatifs d'*A. thaliana* contenant le gène *cdc2a* muté au niveau du résidu D147, remplacé par un résidu N147, inactivant ainsi l'activité kinasique, sous le contrôle du promoteur At2S2 codant l'albumine 2S2. Le gène At2S2 s'exprime lors des phases tardives (à partir du stade cœur) de l'embryogenèse dans tout l'embryon y compris au niveau des méristèmes. La construction 2S2-*cdc2a*.N147 permet donc l'étude de l'implication de *cdc2a* au cours des phases tardives de l'embryogenèse. La majeure partie des lignées transgéniques obtenues présentent des anomalies du profil apico-basal. Pourtant au stade cœur de l'embryogenèse, les différents organes (racine, hypocotyle et cotylédons) ainsi que les principaux tissus (protoderme, cortex et tissus vaculaires) sont identifiables. L'élaboration du profil apico-basal au sein de l'embryon est hautement liée aux divisions cellulaires, indépendamment de la présence des différents tissus déjà observables à ce stade.

La formation des feuilles se fait au niveau du méristème apical grâce aux cellules qui composent l'anneau initial. L'activité cyclique de ces cellules est donc essentielle à une mise en place correcte de l'appareil foliaire ainsi que des différents tissus de la feuille. Par exemple, la formation des cellules de garde des stomates est possible grâce à la division asymétrique de deux cellules d'épiderme adjacentes. Des plantes d'*A. thaliana* transgéniques présentant une surexpression du gène codant la cycline D3 ont été étudiées. La cycline D3

répond aux phytohormones en particulier aux cytokinines. La surexpression de *cycD3;1* d'*A. thaliana* entraîne la formation de plantes anormales possédant des feuilles repliées le long de leur axe et une augmentation du nombre de cellules. L'épiderme est composé d'un grand nombre de cellules petites, non totalement différenciées. Ces mutants (surexprimant la *cycD3;1*) présentent aussi une désorganisation des méristèmes et une incapacité à former des parenchymes palissadiques et lacuneux distincts (Dewitte *et al.*, 2003). A l'opposé, la surexpression du gène *cycD2* dans des plants de tabac entraîne une augmentation du nombre de divisions ayant pour conséquence une croissance plus accrue de la plante, mais n'affectant pas sa morphologie (Cockcroft *et al.*, 2000). La cycline D2 semble réguler la division cellulaire pour la mise en place des profils d'organisation des différents organes, alors que la cycline D3 semble pouvoir intervenir en aval afin de diriger les divisions cellulaires. La surexpression de *KRP2* d'*A. thaliana* entraîne un dérèglement du cycle cellulaire au sein des primordiums de feuilles, sans toutefois modifier l'équilibre division cellulaire/différenciation (De Veylder *et al.*, 2001).

Beeckman *et al.* (2001) ont étudié chez *A. thaliana* les stades du cycle cellulaire dans lesquels se trouvent les cellules du péri-cycle avant la formation des racines latérales. Les cellules du péri-cycle situées face aux pôles de proto-phloème sont bloquées au niveau de la phase G1 du cycle cellulaire. Dans les parties les plus âgées de la racine, lieu où sont initialisées les racines latérales, les cellules situées face aux pôles de protoxylème passent en phase G2. La réactivation cellulaire de ces cellules du péri-cycle pourrait se faire grâce à un facteur radial provenant du protoxylème.

Plusieurs gènes contrôlant le cycle cellulaire ont été étudiés au cours du développement racinaire. Des plants de tabac transgéniques exprimant le gène *cdc25* de levure, présentent un nombre de primordiums de racines latérales anormalement élevé. Ces primordiums sont beaucoup plus petits que chez la plante sauvage et présentent une diminution de la taille des cellules en mitose (McKibbin *et al.*, 1998). D'un autre côté, la surexpression du gène de la cycline mitotique *cycB1;1* sous le contrôle du promoteur constitutif de la kinase *CDKA;1* d'*A. thaliana*, conduit à l'augmentation de la vitesse de croissance des racines latérales ainsi que du nombre de cellules les composant sans toutefois modifier la taille des racines latérales (Doerner *et al.*, 1996). De Veylder *et al.* (1999) ont réussi chez *Arabidopsis*, à montrer que l'expression de la cycline *D4;1* était spécifiquement retrouvée dans les primordiums de racines latérales en réponse à des stimuli comme le saccharose, constituant ainsi un des éléments-clé de la formation des racines latérales. Enfin, la mise en évidence, par immunodétection, de l'accumulation chez le maïs de plusieurs

cyclines mitotiques durant la formation des racines latérales montre que ces dernières doivent avoir des rôles spécifiques lors de ce mécanisme du développement racinaire (Mews *et al.*, 2000).

Des plantes d'*A. thaliana* possédant le gène KRP2 sous le contrôle du promoteur fort 35S et donc surexprimant KRP2, présentent une réduction de plus de 60% du nombre de primordiums de racines latérales. KRP2 semble donc jouer un rôle très important dans la régulation du cycle cellulaire au niveau des cellules du péri-cycle situées face aux pôles de xylème. KRP2 régulerait l'initiation des racines latérales en bloquant la transition G1/S. Des expériences de RT-PCR en présence et en absence d'auxines, montrent une régulation transcriptionnelle du gène *krp2* par les auxines (Himanen *et al.*, 2002).

Ces quelques résultats montrent que, tout au long de la vie de la plante, la formation des nouveaux organes ou des nouveaux tissus est hautement régulée par une activité mitotique importante contrôlée par les gènes régulateurs du cycle cellulaire. L'étude de gènes marqueurs contrôlant ainsi le cycle cellulaire est donc un bon moyen pour comprendre les mécanismes de développement chez les plantes. Pour nos études, nous avons utilisé la chicorée de Bruxelles ou *C. intybus*, dont la racine est, pour l'agriculture régionale, l'organe le plus important. En effet, comme nous l'avons mentionné dans le premier paragraphe, la racine mature de *C. intybus* est une racine tubérisée, lieu de stockage de l'inuline. Des études, concernant la réorientation métabolique au cours de la tubérisation ont déjà été réalisées au laboratoire (Druart *et al.*, 2000, 2001). Nous avons choisis pour ces travaux une approche différente afin d'étudier les phases du développement de la racine : germination, croissance primaire, formation des racines latérales et mise en place et activité du cambium libéro-ligneux, par le biais de l'expression de gènes marqueurs du cycle cellulaire.

CHAPITRE I



Introduction

Dans ce premier chapitre, nous présentons les résultats concernant les événements du développement de la racine de chicorée qui précèdent la mise en place des tissus secondaires. Ils concernent le développement racinaire au cours de la germination, l'activité mitotique au sein apex racinaires ainsi que la formation des racines latérales.

Avant d'acquérir la fonction d'organe puits, stockant l'inuline, le système racinaire de la chicorée, comme celui de toutes les plantes supérieures, possède des fonctions biologiques importantes. Le système racinaire permet non seulement de fixer la plante au sol, mais aussi d'y absorber l'eau et les éléments minéraux essentiels à la croissance de la plante. Pour faciliter cette absorption, la surface de contact avec le sol est considérablement augmentée par la présence de poils absorbants et par la formation d'un réseau de racines latérales. Le système racinaire est aussi le lieu de synthèse de substances végétales importantes telles que les hormones (cytokinines, gibbérellines, acide abscissique) ou des substances allélopathiques.

Au sein des racines, les divisions cellulaires sont regroupées au sein de zones méristématiques primaires (méristèmes apicaux) et secondaires (primordiums de racines latérales, cambiums), formés à partir de cellules partiellement ou totalement différenciées. Le cycle cellulaire est composé de quatre phases successives : G1, S (duplication de l'ADN), G2 et M (Mitose). La progression des cellules à travers le cycle cellulaire est régulée par des complexes enzymatiques, composés d'une sous unité catalytique, la kinase dépendante des cyclines (CDK) et d'une sous unité régulatrice, la cycline. Chez les plantes, deux groupes de cyclines sont présents. Les cyclines D sont responsables de la transition G1/S alors que les cyclines mitotiques de type A et B sont responsables de la transition G2/M. Nous avons opté, pour l'étude de l'activité de deux promoteurs de cyclines (*cycB1;1* et *cycA2;1*) d'*A. thaliana*. Comme il est signalé précédemment, le gène *cycB1;1* est exprimé chez *A. thaliana*, spécifiquement dans les cellules en division ou dans les cellules réactivées pour ré-entrer dans le cycle cellulaire (Ferreira *et al.*, 1994). Le gène *cycA2;1* possède quant à lui un profil d'expression plus large, pouvant être détecté dans certaines cellules différenciées. L'activité de ce gène semble donc être corrélé non pas avec les divisions cellulaires mais avec la compétence des cellules à se diviser (Bursens *et al.*, 2000). L'étude de l'expression de ces deux promoteurs dans la racine de chicorée a été réalisée par l'intermédiaire de tests

histochimiques GUS, effectués sur des plantes transformées à l'aide des constructions pCycB1;1-*uidA* et pCycA2;1-*uidA*, où le gène *uidA*, d'*E. coli*, code la β -glucuronidase.

Les résultats de ces travaux sont présentés dans ce chapitre sous forme d'un article scientifique soumis à Journal of Experimental Botany.

**Promoter activity of *At;CycA2;1* and *At;CycB1;1* during root development
of *Cichorium intybus L.* cv Witloof**

POULAIN Jérôme^{*}, HUSS Brigitte^{*♦}, INZE Dirk⁺ and RAMBOUR Serge^{*}

* Laboratoire de Physiologie de la Différenciation Végétale, Bâtiment SN2, 3^{ième} étage,
Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France.

+ Department of Plant Systems Biology, Technologiepark 927, B-9052 Ghent, Belgium.

♦ Corresponding author: Huss Brigitte, Tel: 03 20 43 41 02, Fax: 03 20 43 33 60,
brigitte.huss@univ-lille1.fr



Introduction

Parmi les événements du développement du système racinaire de *Cichorium intybus*, il en est un qui présente une importance considérable sur le point de vue agronomique. Contrairement au modèle *A. thaliana*, la chicorée développe une racine pivot tubérisée, lieu de synthèse et de stockage d'un dérivé sucré, l'inuline. La tubérisation de la racine est le résultat d'une croissance en épaisseur importante couplée à une réorientation métabolique. Au cours de la tubérisation, les activités des enzymes clés de la voie de biosynthèse de l'inuline augmentent au sein de la racine (Druart *et al.*, 2001). Ce composé sucré est alors stocké dans les cellules parenchymateuses secondaires produites par le cambium vasculaire (Van den Ende *et al.*, 2000). Les divisions cellulaires au niveau de la zone cambiale apparaissent donc comme un événement clé du processus de tubérisation de la racine de chicorée. La progression des cellules à travers le cycle cellulaire est contrôlée par des complexes enzymatiques formés d'une sous unité catalytique, la CDK et d'une sous unité régulatrice, la cycline.

Nous avons entrepris d'étudier l'activité du promoteur de la cycline B1;1 d' *A. thaliana* lors de la mise en place et l'activation de ce cambium vasculaire. Chez cette plante, *cycB1;1* est exprimé exclusivement dans les cellules en division ou dans les cellules qui sont réactivées pour ré-entrer dans le cycle cellulaire (Ferreira *et al.*, 1994). Lors de la formation des racines latérales, il apparaît même que son expression précède l'observation des premières divisions des cellules du péricycle (Ferreira *et al.*, 1994).

Afin d'analyser de manière fine les résultats apportés par les tests histochimiques GUS, réalisés au cours de la croissance en épaisseur, il nous a fallu préalablement réaliser des études morphologiques concernant les différentes étapes de la mise en place et de l'activité du cambium vasculaire au sein de la racine de chicorée cultivée *in vitro* sur un milieu H₂O. Les résultats de ces travaux sont présentés dans ce chapitre sous la forme d'une publication scientifique soumise à Journal of Experimental Botany.

Enfin, nous montrerons aussi que la connaissance apportée par les études morphologiques de la croissance en épaisseur a permis la réalisation d'autres travaux, menés au laboratoire par la technique de cDNA-AFLP, concernant l'expression différentielle de marqueurs moléculaires au cours du développement de la racine de chicorée. Ces travaux ont fait l'objet d'un article publié dans Journal of Plant Physiology.

**MORPHOLOGICAL ANALYSIS AND EXPRESSION OF CYCB1,1-GUS IN
THE EARLY STAGES OF *CICHORIUM INTYBUS* TUBER ROOT
FORMATION**

Poulain Jérôme, Kimpe Valérie, Richard Caroline, Inzé Dirk⁺, Rambour Serge, Huss Brigitte[♦]

Laboratoire de physiologie de la différenciation végétale, Université des Sciences et Technologies de Lille, Bâtiment SN2, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France.

+ Laboratorium voor genetica, Department of genetics, Flanders Interuniversity Institute for Biotechnology, Universiteit Gent, K.L. Ledeganckstraat 35, B-9000 Gent, Belgium

♦ Corresponding author: Huss Brigitte, Tel: 03 20 43 41 02, Fax: 03 20 43 33 60 ,
brigitte.huss@univ-lille1.fr

Submission: 9 April 2003

Abbreviations

PBS	Phosphate Buffer Saline
BAP	6-Benzyl-Aminopurine
MS	Murashige and Skoog

cDNA-AFLP display for the isolation of differentially expressed genes during chicory root development

Pascale Goupil, Yonis Soubere Mahamoud, Jérôme Poulain, David Windels, Patrice Créte, Brigitte Huss and Serge Rambour

Université des Sciences et Technologies de Lille, Physiologie et Génétique Moléculaire Végétales, Bâtiment SN2, F-59655 Villeneuve d'Ascq cedex, France

Summary

To identify genes expressed during root enlargement in early vegetative growth of chicory (*Cichorium intybus* L.), we used the cDNA-AFLP technology. The radial pattern of chicory roots was investigated by histological analysis to determine the spatial vascular cambium setting. In young plantlets, serial root sections showed that differentiation of secondary tissues occurred along a gradient extending from the apex to the crown. The cDNA-AFLP technique was carried out on total mRNAs extracted from root tissues producing secondary structures and root tissues developing primary structures only. This study reports on the isolation of two transcript-derived fragments (TDFs) referred as Y-16 and Y-21. Sequence analysis at the protein level showed that Y-16 carries a sequence highly homologous (93% identities) to the amino acid transporter-like protein 1 (AATL1) from *Arabidopsis* and Y-21 presents 72% identities with AAD25141.1 *Arabidopsis* protein. The expression pattern of both these TDFs was analysed by northern and showed an overexpression during early development of chicory roots.

Key words: cDNA-AFLP, chicory, root



Introduction

Dans les chapitres I et II, l'expression de gènes contrôlant le cycle cellulaire au cours du développement de la racine de chicorée a été étudiée par l'observation de l'activité de la β -glucuronidase. Ces travaux ont été réalisés sur des chicorées transformées contenant le gène rapporteur *uidA* sous le contrôle des promoteurs pCycB1;1 ou pCycA2;1 d'*A. thaliana*. Dans cette troisième partie, nous présentons une approche différente basée sur l'isolement et la caractérisation de gènes contrôlant le cycle cellulaire, homologues de la chicorée.

Chez la chicorée, aucun gène contrôlant le cycle cellulaire n'a jusqu'alors été isolé et caractérisé. Parmi l'ensemble des gènes, contrôlant le cycle cellulaire, qui ont été décrits chez d'autres espèces végétales, nous avons décidé de débiter ces recherches par l'isolement et la caractérisation d'un gène de chicorée de la famille des cyclines mitotiques de type B. Les résultats de ces travaux sont présentés dans ce troisième chapitre.

Dans un premier temps, un fragment d'ADNc de chicorée a été amplifié par PCR en utilisant un couple d'amorces dégénérées dirigées contre les cyclines végétales de type B. A partir de ce fragment, l'ADNc correspondant à la séquence codante a pu être isolé par PCR. Enfin, l'expression de ce gène de chicorée au cours du cycle cellulaire a été étudiée dans des suspensions cellulaires de chicorée par la technique de RT-PCR semi-quantitative en temps réel.

Matériels et Méthodes

1. Suspensions cellulaires de cellules de chicorée

1.1 conditions de culture

Les suspensions cellulaires de chicorée sont issues de cals provenant d'explants racinaires de *C. intybus* L. var. Witloof (Dubois *et al.*, 1988). Ces cellules sont maintenues en culture dans un milieu liquide de Murashige et Skoog (1962) comprenant 58,4 mM de saccharose, 3,42 mM de glutamine, 0,55 mM d'inositol, 9,6 µM d'acide naphtylacétique, 90 mM d'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique et 90 mM de kinétine, sous une photopériode de 12h à 20°C et sous agitation rotative.

Le repiquage des cellules est effectué tous les 14 jours. Après filtration à travers deux filtres successifs en acier, respectivement de 1 mm et de 125 µm, environ 5 g de cellules sont placés dans 200 ml de milieu neuf.

1.2 blocage de la division par des inhibiteurs du cycle cellulaire

Parmi les inhibiteurs de division cellulaire, l'hydroxyurée (HU) et l'oryzaline (ory) bloquent la division cellulaire respectivement lors de la transition G1/S et lors de la phase M (en métaphase) du cycle cellulaire (Planchais *et al.*, 2000). L'hydroxyurée (15 mM) ou l'oryzaline (15 µM) sont ajoutées directement au milieu de culture, 5 jours après le repiquage des cellules, pendant la phase exponentielle de croissance (Legrand, 2002). Les cellules sont filtrées et broyées dans l'azote liquide 24 heures après. Les broyats sont conservés à -80°C.

2. Extraction des ARN totaux

L'extraction des ARN totaux est réalisée grâce au kit Tri ReagentTM (Euromedex), suivant le protocole du fournisseur. Le matériel utilisé est préalablement traité pour éviter la dégradation des ARN par les RNases. Un ml de Tri ReagentTM est ajouté à 200 mg de cellules broyées, dans un microtube de 1,5 ml. Après une extraction au chloroforme, les ARN sont précipités dans l'isopropanol, puis sont centrifugés à 12000g à 4°C pendant 15 minutes. Les culots d'ARN sont séchés sous une hotte à flux laminaire (ESI, Flufrance), puis sont

resuspendus dans un volume de 49 μl d'eau traitée avec du Diéthylpyrocarbonate (DEPC) 1/1000 v/v (Sigma), auquel on ajoute 1 μl d'inhibiteur de RNases (Roche[®]). Afin de faciliter la resuspension, les tubes sont placés pendant 10 minutes dans un bain-marie maintenu à 60°C. Les ARN ainsi resuspendus sont conservés à -80°C.

3. Quantification des ARN totaux

Le dosage des ARN totaux est réalisé à 260 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (930 Uvikon). Les ARN sont dilués au 1/500^{ième} pour le dosage. La concentration (C) est alors calculée comme suit :

$$C (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = \text{D.O.}_{260\text{nm}} \times 40 \times \text{facteur de dilution} \times 1000$$

sachant qu'une D.O. $_{260\text{nm}} = 1$ correspond à 40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ d'ARN.

4. Synthèse des ADNc

4.1 Synthèse des premiers brins d'ADNc

La synthèse des premiers brins d'ADNc est réalisée à partir de 5 μg d'ARN totaux. La transcription inverse se fait avec l'enzyme SuperScriptTM II (Gibco BRL[®]). La réaction se déroule comme suit :

Dans un microtube, 1 μl de dNTP (10 mM) et 1 μl d'oligodT-VN-KpnI (10 μM), où V=A,C ou G et N= A, C, G ou T, sont ajoutés à 5 μg d'ARN totaux, dans un volume final de 10 μl . Cette amorce porte, à l'extrémité 5', un site de reconnaissance de l'enzyme de restriction KpnI : 5'-ggccacgc**ggtacca**agtactttttttttttvn-3', permettant l'augmentation de la température d'hybridation au cours de la PCR. Le mélange est dénaturé pendant 5 minutes à 65°C puis placé immédiatement sur glace. La réaction de transcription inverse est réalisée à 42°C pendant 1 heure en présence de 4 μl de tampon 5X (Tris-HCl pH 8,5 250 mM, KCl 375 mM, MgCl₂ 15 mM), 1 μl de SuperscriptTM II (200 u/ μl), 4 μl de MgCl₂ 25 mM, 2 μl de DTT 0,1 M et de 1 μl d'inhibiteur de RNases (400 u/ μl). La réaction est stoppée par chauffage à 70°C pendant 15 minutes. Les matrices ARN sont digérées à 37°C pendant 20 minutes en présence de 2 unités de RNase H d'*E. coli* (Gibco BRL[®]).

4.2 Polyadénylation des premiers brins

La polyadénylation a pour but d'ajouter une queue poly(A) à l'extrémité 3' du premier brin d'ADNc synthétisé afin de pouvoir synthétiser les seconds brins à l'aide de la même amorce oligodT-VN-KpnI (figure 1). La réaction est réalisée dans un volume final de 50 µl sur l'ensemble des premiers brins d'ADNc par la Transférase Terminale (Roche[®]) en présence de 10 µl de tampon 5X (cacodylate de potassium 1M, Tris-HCl pH 6,6 125 mM, sérum albumine bovine 1,25 mg/ml), 0,4 µl d'enzyme (400 u/µl), 3 µl de CoCl₂ 25 mM et 3,1 µl de dATP 100 µM. Elle se déroule à 37°C pendant 15 minutes. L'enzyme est ensuite inactivée par un chauffage à 70°C pendant 10 minutes. Les produits sont purifiés sur colonne Qiaquick PCR Purification Kit (Qiagen) d'après le protocole établi par le fournisseur.

4.3 Synthèse des seconds brins d'ADNc

La synthèse des seconds brins d'ADNc est réalisée à l'aide de l'amorce oligodT -VN-KpnI. Ainsi la présence du site de coupure par KpnI de chaque côté des ADNc double brins va faciliter, après digestion, la formation de molécules circulaires (Figure 1). La synthèse des seconds brins est réalisée par la Taq Gold (Perkin Elmer) dans un volume final de 50 µl à partir de l'ensemble des ADNc simple brin. Le mélange réactionnel se compose de :

5 µl de tampon Taq Gold 10X, 2 µl d'oligo -dT-VN-KpnI, 4 µl de MgCl₂ 25 mM, 4 µl de dNTP 25 mM et de 0,5 µl de Taq Gold (5u/µl). La synthèse est réalisée par amplification linéaire selon le programme suivant : 10 minutes à 95°C; 20 secondes à 94°C; 30 secondes à 36°C; 20 minutes à 72°C, avec une transition de 36°C à 72°C à une vitesse réduite de 30% par rapport à la vitesse standard de chauffage du thermocycler (PTC-200, MJ Research).

5. Techniques de PCRs

5.1 Définition d'amorces dégénérées et amplification par PCR

Les amorces dégénérées sont définies à l'aide du logiciel Codehop (COnsensus-DEgenerate Hybrid Oligonucleotide Primer) basé sur la stratégie de définition d'amorces dégénérées de Rose *et al.* (2003). Le principe consiste à aligner des séquences protéiques de plusieurs espèces et d'en extraire des motifs conservés d'une espèce à l'autre. La définition des amorces est alors réalisée à partir de ces motifs par un algorithme informatique disponible sur le site <http://blocks.fhcrc.org/codehop.html>. Chaque amorce dégénérée est constituée d'une extrémité 5' non dégénérée d'une vingtaine de paires de bases et d'une extrémité 3' de

10 à 12 pb qui présente des dégénérescences. Trois ou 4 acides aminés conservés dans la région 3' suffisent à cette définition.

Les réactions d'amplification sont réalisées sur des ADNc issus d'ARN totaux préparés à partir de suspensions cellulaires de chicorée, prélevées au quatrième jour après repiquage sur milieu neuf. La réaction d'amplification est faite dans un volume final de 20 µl composé de 2 µl de tampon Taq 10X (Tris-HCl pH 9 100 mM, KCl 500 mM, MgCl₂ 15 mM, Triton X-100 1%, BSA 2 mg/ml; Qbiogen®), de 1µl de chacune des deux amorces dégénérées (10 mM), de 0,2 µl de dNTP 25 mM, de 0,1 µl de Taq polymérase (5u/µl; Qbiogen®) et de 1µl d'ADNc (provenant des 50 µl préparés à partir de 5 µg d'ARN totaux). Les conditions de la PCR sont les suivantes :

94°C pendant 5 minutes

30X { 94°C pendant 1 minute
49°C pendant 1 minute et 30 secondes
70°C pendant 1 minute et 30 secondes

La réaction est terminée par une extension finale à 70°C pendant 10 minutes.

La taille et la quantité approximative des produits de la PCR sont vérifiées par électrophorèse sur un gel d'agarose à 0,8%.

5.2 PCR inverse

Le principe de la PCR inverse est d'amplifier les régions adjacentes à une région connue. L'amplification est réalisée sur des ADNc pleine longueur circulaires à l'aide d'amorces spécifiques dirigées vers les extrémités 5' et 3' du fragment d'ADNc connu (Silver et Keerikate, 1989; figure 1). Cette technique a été optimisée pour la chicorée par Duban (2000).

5.2.1 Amplification non spécifique

Après la synthèse des seconds brins d'ADNc (paragraphe 4.3), une amplification non spécifique permet d'obtenir une quantité suffisante d'ADNc pour la ligature intramoléculaire. Cette amplification est réalisée par la Taq Gold polymérase (Perkin Elmer®) dans un volume final de 30 µl en présence de 3 µl de tampon Taq Gold 10X (150 mM Tris-HCl pH 8, 500 mM KCl, 25 mM MgCl₂), de 2,4 µl de MgCl₂ 25 mM, de 2,4 µl de dNTP 25 mM, de 0,3 µl de Taq Gold (5 u/µl), de 1 µl d'amorce oligodT -VN-KpnI (10mM) et de 4 µl d'ADNc double

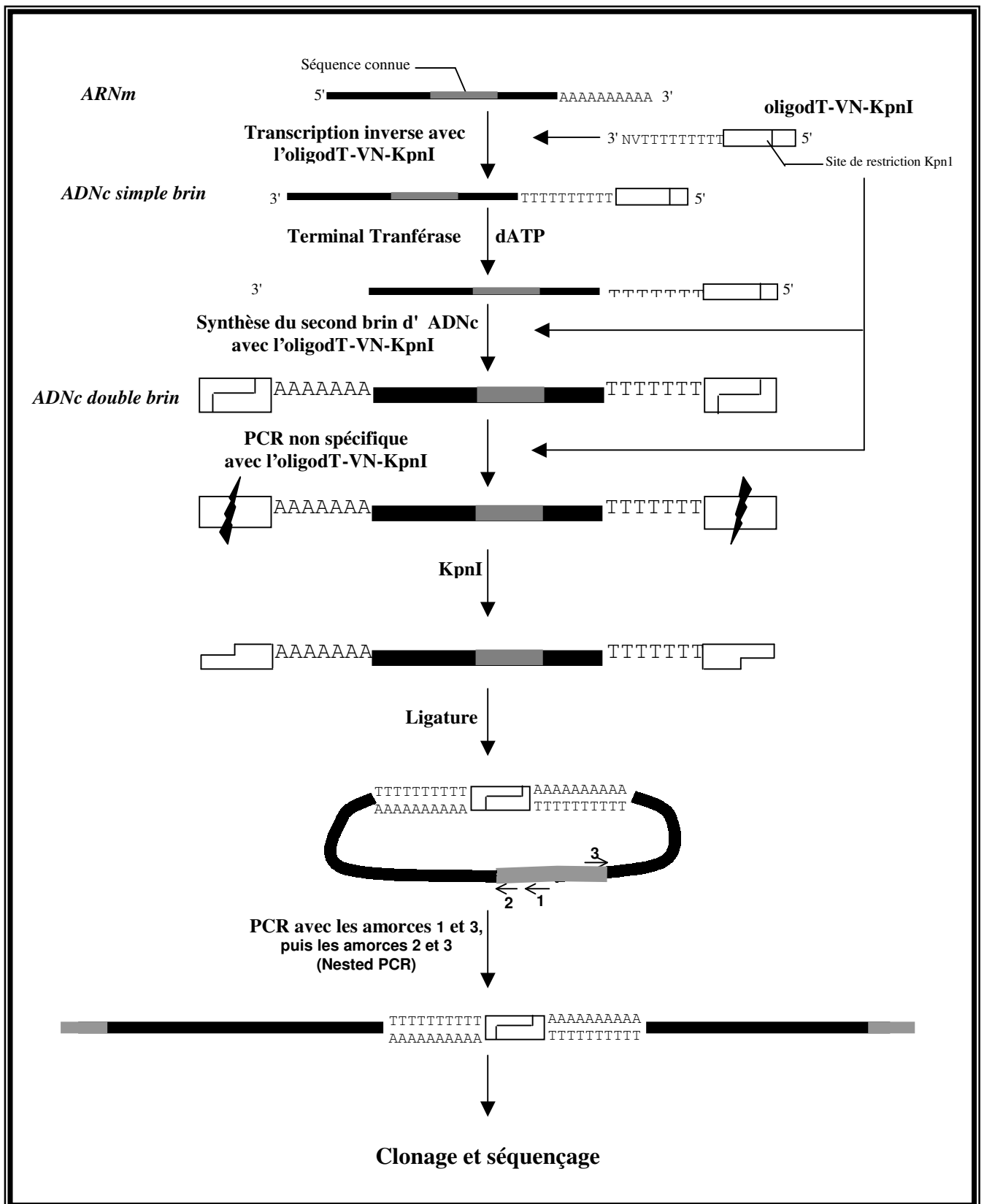


Figure 1 : Principe de la PCR inverse.

brin (1/5^{ième} des ADNc synthétisés à partir de 5 µg d'ARN totaux). Les conditions PCR sont les suivantes :

- activation de la Taq Polymérase pendant 7 minutes à 95°C

Puis 15 cycles de :

- dénaturation pendant 30 secondes à 94°C
- hybridation des amorces pendant 30 secondes à 55°C
- élongation pendant 1 minute 30 à 72°C

Puis 25 cycles de :

- dénaturation pendant 30 secondes à 94°C
- hybridation des amorces pendant 30 secondes à 55°C
- élongation pendant 1 minute 30 à 72°C avec une auto-extension de 5 secondes

par cycle pour favoriser l'amplification des fragments les plus longs.

Une extension finale est réalisée à 72°C pendant 7 minutes.

Les produits amplifiés sont purifiés sur colonne Qiaquick PCR Purification Kit (Qiagen) et repris dans 50 µl d'eau distillée stérile.

5.2.2 Digestion des ADNc double brin

La totalité des produits de PCR purifiés est concentrée par évaporation jusqu'à un volume de 44 µl puis digérée pendant deux heures à 37°C dans un volume final de 50 µl en présence de 1 µl d'enzyme de restriction KpnI (10 u/µl; Roche) et de 5 µl de tampon de restriction X10 (Tris-HCl 100 mM pH7, MgCl₂ 100 mM, Dithioérythritol 10mM). Les produits digérés sont purifiés sur colonne Qiaquick PCR Purification Kit, puis repris dans 45 µl d'eau.

5.2.3 Ligature intramoléculaire des ADNc double brin

La ligature est réalisée par la T4 DNA ligase (Biolabs) dans un volume final de 300 µl pendant une nuit à 16°C en présence de 30 µl de tampon 10X (300 mM Tris-HCl pH 7.8, 100 mM MgCl₂, 100 mM Dithioérythritol, 10 mM ATP) et de 1 µl d'enzyme (400u/µl). Les produits de ligature sont ensuite précipités pendant 1 heure à -20°C en présence de 2,5 volumes d'éthanol absolu et d'acétate de sodium (0,3M). Après centrifugation pendant 20 minutes à 15000g, les culots sont lavés dans 1 ml d'éthanol 70% puis séchés et repris dans 20 µl de tampon Tris-HCl 10 mM, pH 8,5.

5.2.4 Amplification des régions flanquantes

Afin d'augmenter la spécificité des produits amplifiés, deux réactions de PCR successives sont réalisées (« Nested PCR »; figure 1). La première réaction est effectuée avec les amorces 1 et 3, la seconde avec les amorces 2 et 3, dont les séquences sont les suivantes :

Amorce 1 dirigée vers l'extrémité 5' de l'ADNc **5'-ATTTGAATTTGGGGCTTTCC-3'**

Amorce 2 dirigée vers l'extrémité 5' de l'ADNc **5'-AGTGGAAGCAGGCACAAGAT-3'**

l'amorce 2 étant plus externe que l'amorce 1 (figure 1)

Amorce 3 dirigée vers l'extrémité 3' de l'ADNc **5'-CGTTGACCGATACCTTTCC-3'**

La première PCR inverse est réalisée sur 1 µl d'ADNc avec la Taq polymérase Perkin Elmer en présence de 1,5 µl de tampon II 10X (100 mM Tris-HCl pH8,3, 500 mM KCl), de 1,2 µl de MgCl₂ 25 mM, de 1,2 µl de dNTP 25 mM et de 0,4u de Taq Polymérase. Les conditions d'amplification sont les suivantes :

4 minutes à 92°C

25 X { 30 secondes à 94°C
30 secondes à 55°C
1 minute 30 à 72°C

Une extension finale est réalisée à 72°C pendant 7 minutes.

Afin d'améliorer la spécificité, une Nested PCR est réalisée à l'aide des amorces 2 et 3, dans les mêmes conditions, sur les produits de la première amplification dilués au 1/1000^{ième}. Les produits PCR sont ensuite purifiés, clonés et séquencés.

5.3 RT-PCR semi-quantitative en temps réel

La RT-PCR semi-quantitative en temps réel consiste en un dosage relatif des ARNm d'un gène cible par rapport aux ARNm d'un gène témoin de normalisation (Bustin, 2002). Dans notre cas, nous avons utilisé cette technique afin d'étudier l'expression de gènes dans des suspension cellulaire de chicorée. Des ADNc simple brin sont préparés à partir de 5 µg d'ARN totaux au 30^{ème}. L'amplification est réalisée sur ces ADNc simple brin dilués en utilisant des amorces spécifiques définies à l'aide du logiciel Beacon De signer[®] (Biosoft). Les quantifications sont répétées trois fois pour chaque couple d'amorces. Une amplification similaire, utilisant comme matrice des ADNc dilués au 20^{ème}, 40^{ème} et 80^{ème}, permet de réaliser une courbe standard. Les conditions de validité de la technique sont, comme

recommandées par Bustin (2002), $1 \geq E \geq 0,85$ et $r^2 \geq 0,985$ où E est l'efficacité de l'amplification et r^2 le coefficient de corrélation obtenu d'après la courbe standard. Les amplifications ainsi que la détection des produits sont réalisées, dans des plaques de 96 puits (Biorad), à l'aide d'un IQcycler de Biorad[®], en utilisant le kit SYBR[®] green de Quantitech[™]. Pour un volume final de 20 μ l, le mélange réactionnel est composé de 10 μ l de tampon MASTERMIX SYBR green 2X (HotStart Taq[™] DNA Polymerase, Quantitech SYBR Green PCR Buffer, dNTP mix incluant dUTP, SYBR Green I, MgCl₂ 5mM), de 0,2 μ l de fluorescéine (1 μ M), de 0,75 μ l de chacune des deux amorces (10 μ M), de 5 μ l d'ADNc simple brin dilués au 1/30^{ième}, et H₂O ultrapure QSP 20 μ l. Les conditions PCR sont les suivantes :

activation de la HotStart Taq[™] 10 minutes à 95°C

Puis 50 cycles de :

dénaturation pendant 30 secondes à 95°C

élongation pendant 45 secondes à 60°C

Une courbe de dénaturation des produits amplifiés, allant de 65°C à 95°C par pallier de 0,5°C, est réalisée. La présence d'un seul pic, correspondant à la température de dénaturation des produits amplifiés, permet de confirmer la synthèse d'une seul amplificat lors de la réaction.

6. Clonage de produits PCR

Le clonage des produits d'amplification a été réalisé à l'aide du kit pGEM[®]-T Easy Vector System (Promega[®]).

6.1 Ligature d'un fragment d'ADNc dans le plasmide pGEM[®]-T

La quantité en μ g d'amplificat à mettre en présence du vecteur pGEM[®]-T easy vector (annexe 1 ; Promega[®]) est calculée d'après la formule suivante :

$$\text{ng insert} = \text{ng vecteur} \times (\text{taille insert}/\text{taille vecteur}) \times 3$$

Les quantités des produits PCR sont estimées sur un gel d'agarose à 0,8%.

Le mélange de ligature est composé de 5 μ l de tampon de ligature «rapide» 2X (Tris-HCl pH 7,8 60 mM, MgCl₂ 20 mM, DTT 20 mM, ATP 2 mM, Polyéthylène Glycol-8000 10%), de 1 μ l de vecteur pGEM[®]-T (50 ng/ μ l), de X μ l d'insert (où X est calculé d'après la formule précédemment citée) et de 1 μ l de T4 DNA Ligase (3 unités/ μ l), et H₂O ultrapure QSP 10 μ l. La ligature est réalisée pendant une nuit à 4°C.

6.2 Transformation des bactéries compétentes JM109

Cinquante μl d'une suspension de bactéries compétentes JM109 (Promega) sont transformées avec 5 μl du mélange de ligature. Après 30 minutes d'incubation sur glace, les bactéries subissent un choc thermique à 42°C pendant 60 secondes, puis le tube est replacé directement sur la glace. Un ml de milieu SOC (2% tryptone, 0,5% extrait de levure, 10mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 20 mM glucose) est ajouté. Les bactéries sont incubées pendant 1 heure à 37°C sous agitation rotative (120 rpm) sans agent de sélection puis étalées sur un milieu LB (10g bactotryptone, 5g bacto yeast extract, 10g NaCl, pH 7,5 qsp 1L) gélosé en présence de 50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ d'ampicilline et de 800 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside) et incubées pendant une nuit à 37°C.

6.3 Contrôle des clones recombinants

Les colonies blanches sont prélevées à l'aide d'un embout plastique stérile et placées dans 50 μl de TTE 1X (Triton X-100 1%, Tris-HCl pH8,5 1M, EDTA pH8 0,5M). Le mélange est chauffé à 95°C pendant 10 minutes de manière à faire éclater les bactéries. La PCR est réalisée avec 2,5 μl de TTE à l'aide des amorces M13 Forward (5'-GTAAAACGACGGCCAG-3') et M13 Reverse (5'-CAGGCAAACAGCTATGAC-3') présentes sur le plasmide de part et d'autre du site d'insertion. Les clones positifs sont ceux, qui après vérification par électrophorèse sur un gel d'agarose à 0,8%, présentent un fragment dont la taille correspond à celle de l'insert, augmentée de 220 pb. Ces amplificats serviront de matrice pour les réactions de séquence.

7. Séquençage des ADNc

Le séquençage se fait selon la méthode de terminaison de chaînes (Sanger, 1975). Ce principe utilise l'incorporation de didéoxynucléotides triphosphates (ddNTP) au cours d'une réaction de synthèse du brin complémentaire à l'ADN servant de matrice. Les ddNTP, lors de l'incorporation, bloquent l'élongation. Les réactions de séquence sont réalisées à l'aide du kit de séquençage ABI PRISM Dye Primer Cycle Sequencing Core Kit (Applied Biosystems®) en utilisant les amorces Sp6 (5'-ACTCAAGCTATGCATCCAACG-3') et T7 (5'-TAATAGGACTCACTATAGG-3') marquées en 5' par l'ajout d'IRD 800 (Infra Red

Detection; MWG-Biotech AG). La lecture des produits de séquence est réalisée par un séquenceur automatique (LICOR[®] 4200 IR DNA sequencer). Chaque produit d'amplification est déposé dans quatre puits (nommés A,C,G,T). L'IRD 800 présente une longueur d'onde d'excitation égale à 787 nm et une longueur d'onde d'émission égale à 812 nm. La fluorescence émise par l'IRD 800 est lue par un faisceau laser après migration sur un gel de séparation.

7.1 Réactions de séquence

Pour une réaction de séquence :

<u>Mix ddATP ou ddCTP</u>	<u>Mix ddGTP ou ddTTP</u>	<u>Mix Enzyme</u>
0,5 µl ddATP ou ddCTP	1 µl ddGTP ou ddTTP	0,5 µl Taq DNA
1 µl de tampon 5X	2 µl de tampon 5X	polymérase (5u/µl)
1 µl d'amorce T7 ou SP6 marquée	2 µl d'amorce T7 ou SP6 marquée	0,7 µl de tampon 5X
0,5 µl de Mix Enzyme	1 µl de Mix Enzyme	2,1 µl d'eau
0,75 µl d'eau	1,5 µl d'eau	
1,5 µl de matrice	3 µl de matrice	

Les réactions de séquence sont réalisées sur 50 ng de matrice (1,5 µl) dans un thermocycler (PTC-200, MJ Research) d'après les conditions suivantes :

15 X	{	10 secondes à 96°C
		5 secondes à 48°C
		60 secondes à 70°C
15 X	{	10 secondes à 96°C
		60 secondes à 70°C

Les réactions sont arrêtées par l'ajout d'un demi volume de tampon « stop » (formamide 95%, EDTA 10 mM, bleu de bromophénol 0,1%, xylène cyanol 0,1%), puis dénaturées à 94°C pendant 3 minutes avant d'être déposées sur le gel de séquence.

7.2 Gel de séquence

Un gel de 0,2 mm d'épaisseur est préparé à partir d'une matrice Long Ranger[™] (FMC) à 3,75% dans du tampon TBE 1X (134 mM Tris HCl, 45 mM acide borique, 2,5 mM Na₂EDTA) contenant 5M d'urée. Le gel subit une prémigration de 20 minutes à 3000 V, 30 mA, 75 W à une température de 45°C dans du tampon 0,8 X TBE. Après dépôt des réactions

de séquences (environ 1 µl), le gel migre dans les mêmes conditions durant 6 heures. L'image obtenue est traitée à l'aide du logiciel Base ImagIR[®] version 4.0 de LICOR[®]. La séquence obtenue est traduite selon les six cadres de lecture possibles et les séquences protéiques déduites sont confrontées aux bases de données SwissProt/TrEMBL/TrEMBL_NEW sur le site www.expasy.ch.

RESULTATS

1. Isolement d'un ADNc partiel de 616 pb de *Cichorium intybus* homologue aux cyclines de type B1

Bien que les séquences nucléotidiques des cyclines eucaryotiques ne présentent pas d'homologie très importante, les séquences protéiques de ces mêmes cyclines sont beaucoup plus conservées entre les espèces. Afin de déterminer des amorces dégénérées dirigées contre des cyclines mitotiques, nous avons aligné quatre séquences protéiques de cyclines B provenant de quatre espèces végétales différentes (*Nicotiana tabacum*, *Petunia hybrida*, *Chenopodium rubrum* et *Glycine max*; figure 2). Ces séquences possèdent des motifs peptidiques très conservés, parmi lesquels nous avons choisi le motif **RRNRALGDIGNLV**, au sein de la boîte de destruction ainsi que le motif **ELQLVGISAM** au sein de la boîte cycline (figure 2). Nous avons donc utilisé ces deux motifs, notés respectivement « bloc 5' » et « bloc 3' » afin de définir un couple d'amorces dégénérées. Ces deux motifs peptidiques ont été soumis au logiciel Codehop sur le site <http://blocks.fhcrc.org/codehop.html>. Un couple d'amorces, nommées cyc1 et cyc2 et dont les séquences sont les suivantes, a pu être défini :

Amorce cyc1 : 5'-AGAAATAGACGAGCTCTGGGAGAYATHGGNAA-3'

Amorce cyc2 : 5'-GCATAGCAGAAATTCCAACCARYTGNARYTC-3'

où N=A,C,G ou T Y=C ou T R=A ou G H=A ou C

Le nombre de dégénérescences est égal à 16 pour l'amorce 1 et à 64 pour l'amorce 2.

Ces amorces dégénérées ont été utilisées pour l'amplification d'ADNc, préparés à partir d'ARN totaux extraits de suspensions cellulaires de chicorée prélevées deux et quatre jours après le repiquage sur un milieu neuf. Des conditions optimales d'amplification (données dans le matériel et méthodes, paragraphe 5.1) ont été établies après plusieurs mises aux points techniques concernant les étapes d'hybridation (durée et température) et d'élongation (durée) de la PCR ainsi que la quantité de matrice ADNc. Dans ces conditions, la PCR a permis l'amplification d'un fragment d'environ 620 pb (figure 3) dont la taille est très proche de celle attendue d'après les alignements de séquences protéiques de la région amplifiée chez les autres espèces. Ce fragment a été purifié, cloné et séquencé. Après clonage du fragment amplifié, le séquençage dans les deux sens de quatre clones a permis de corriger les éventuelles erreurs imputées à l'amplification ou au séquençage. La séquence

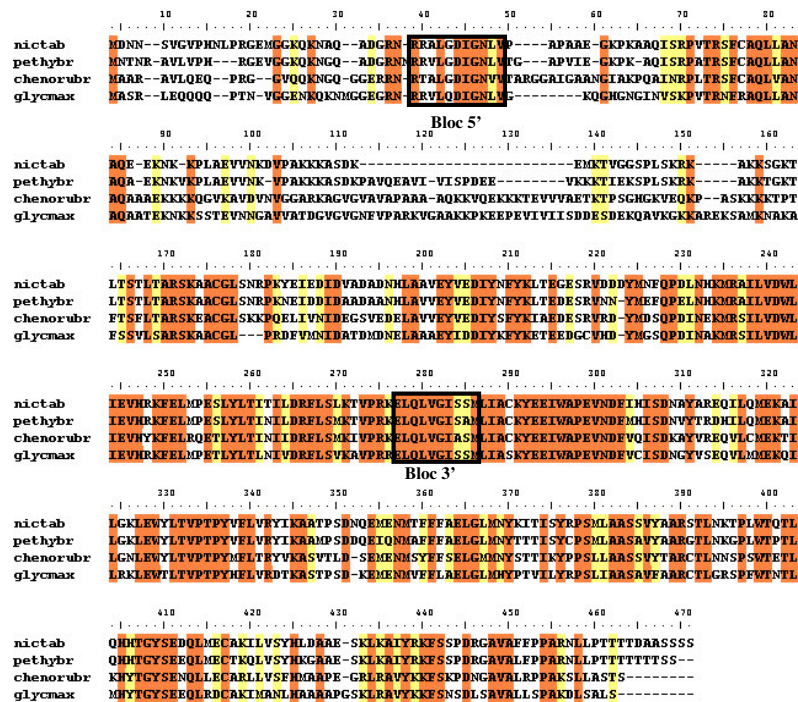


Figure 2 : Alignement de séquences protéiques de cyclines de type B d'espèces végétales. nictab : *Nicotiana tabacum*, pethybr : *Petunia hybrida*, chenorubr : *Chenopodium rubrum*, glymax : *Glycine max*. Les cadres noirs, nommés bloc 5' et bloc 3', représentent les séquences en acides aminés utilisées pour la définition d'amorces dégénérées.

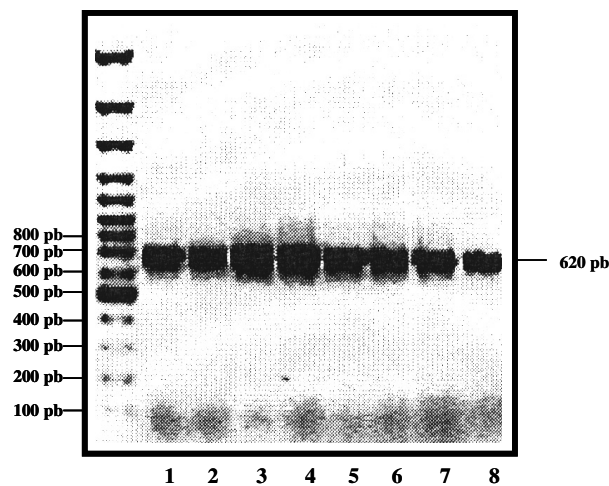


Figure 3 : Electrophorèse sur gel d'agarose 0,8% du fragment de 616 pb amplifié par PCR à l'aide des amorces dégénérées cyc1 et cyc2. Les PCRs ont été réalisées sur différents ADNc provenant de suspensions cellulaires. Les ADNc sont préparés à partir d'ARNs totaux extraits 2 jours (1, 2, 3, 4) ou 4 jours (5, 6, 7, 8) après repiquage sur un milieu neuf. Ils sont utilisés non dilués (1 et 5) ou dilués au 1/2 (2 et 6), au 1/5ième (3 et 7) ou au 1/10ième (4 et 8). 5 µl de produits PCR ont été déposés dans chaque puits. La quantité d'amplificat est estimée par rapport au marqueur de taille 100 pb (Fermentas)

nucléotidique ainsi obtenue est une séquence de 616 pb, flanquée de part et d'autre par les amorces dégénérées *cyc1* et *cyc2* (figure 4). Cette séquence nucléotidique de chicorée a été traduite selon les six cadres de lecture possibles via le site internet www.expasy.ch, puis la séquence protéique déduite a été soumise aux banques de données SwissProt/TrEMBL/TrEMBL_NEW sur internet.

Cette séquence de chicorée, longue de 205 acides aminés, présente des homologies protéiques et nucléotidiques avec des cyclines de type B1 de nombreuses espèces (annexe 2 et 3). Les pourcentages d'identité et de similarité en acides aminés ont été obtenus lors de l'alignement des séquences. D'après les résultats obtenus, la séquence protéique de la cycline de type B1 de *Nicotiana tabacum* semble être la plus proche de celle de *C. intybus*. La séquence protéique de chicorée présente ainsi une identité et une homologie respectivement de 62 et 73% avec la séquence protéique de la cycline de type B1 de *N. tabacum* (tableau 1 ; annexe 2). En ce qui concerne la séquence nucléotidique, les pourcentages d'identité ont été calculés à l'aide du logiciel Bioedit[®] (figure 4). Cette séquence présente une identité de 59% avec la séquence nucléotidique de *N. tabacum* (tableau 1; annexe 2). Renaudin *et al.* (1996) ont aligné les séquences nucléotidiques des cyclines connues au moment de leurs travaux. Ils ont classé ces cyclines en différents groupes en fonction de leurs homologies de séquence avec des cyclines animales et ont calculé les pourcentages d'homologie inter et intra-espèces. L'homologie de séquence au sein de la boîte cycline des différentes cyclines B1 est voisine de 75% (Renaudin *et al.*, 1996). Les pourcentages d'homologies nucléotidiques du fragment obtenu chez la chicorée vis-à-vis des séquences codant des cyclines de type B1 d'autres espèces végétales, sont assez proches des pourcentages calculés par Renaudin *et al.* (1996). Ces homologies semblent montrer que l'ADNc partiel isolé chez la chicorée coderait une cycline mitotique de type B1.

2. Isolement de l'ADNc pleine longueur par la technique de PCR inverse.

Plusieurs possibilités se présentaient à nous afin d'obtenir l'ADNc pleine longueur de la cycline de chicorée. Nous avons tout d'abord tenté d'obtenir les parties 5' et 3' manquantes par la technique de 5' et 3' RACE PCR, à partir d'ARN totaux issus de suspensions cellulaires de chicorée. La 3' RACE PCR a été réalisée sur des premiers brins d'ADNc synthétisés à l'aide d'un oligodT -VN-KpnI et d'une amorce spécifique située en 5' du fragment précédemment isolé. La 5' RACE PCR consiste à ajouter une queue polyG sur la partie 3' des ADNc simple brin synthétisés à partir d'une amorce spécifique dirigée vers le

```

      10      20      30      40      50      60
séquence chicorée AGAATAGACGAGCTCTGGGAGATATAGGTATCTTGTGCCTGCTTCCACTCTTARTGAA
                    Cyc 1
                    Amorce 2
      70      80      90      100     110     120
séquence chicorée ATAGGAAGCCCCAATTCRAATAGCTCGTCCATCACACGAACCTTCCGAGCCCACTG
                    Amorce 1
      130     140     150     160     170     180
séquence chicorée GTGGCAATGCTCAGCTGTAGACRAAATGTAARGAACCACARGAGRAACARCAAC
      190     200     210     220     230     240
séquence chicorée AGTGACGATTTACCCCTGAAAACCACGAGAAACCCCAAAAGAAACATAAAAAACC
      250     260     270     280     290     300
séquence chicorée ACCAAGTCTCTACCTCTGTCTCACCGCTCGTAGTAGGTGGCTTGTGGGATACACA
      310     320     330     340     350     360
séquence chicorée AAACCCAAAGATCCAGTATCABCATAGACGACCCGACATCACAACGACTAGCCGAA
      370     380     390     400     410     420
séquence chicorée GTCGARTACGTAGAGACTCTACAAATCTACAACTCTCAGAAACCGAAGCGGATTA
      430     440     450     460     470     480
séquence chicorée CGCGACTACATGAACCTCACAAACCGATCTAAACGCCAAATGCCAGCCATTTTGTGCGAC
      490     500     510     520     530     540
séquence chicorée TGGTTAATCGAAGTTCACCGAAATTCGAACTCATGCCGAAAGTCTTTGCCTCACGGTC
      550     560     570     580     590     600
séquence chicorée RACATCGTTGACCGATACCTTTCCATGAGAACCGTACCCCGAAGAGCTACAGCTGGTT
                    Amorce 3
                    Cyc 2
      610
séquence chicorée GGATTTCTGCTATGC

```

Figure 4 : Séquence nucléotidique du fragment d'ADNc de 616 paires de bases amplifié à l'aide des amorces dégénérées cyc1 et cyc2 (flèches rouges). Les amorces utilisées pour l'amplification par PCR inverse sont indiquées par les flèches noires (amorces 1, 2 et 3).

côté 5' de la matrice ARN. Une amplification à l'aide d'un oligodC et de l'amorce spécifique est ensuite réalisée sur les ADNc simple brin. Aucun fragment d'intérêt n'a été amplifié en utilisant ces approches.

La troisième technique utilisée est la PCR inverse. Cette technique consiste à synthétiser des ADNc pleine longueur, effectuer des ligatures intramoléculaires sur ceux-ci et amplifier, à l'aide d'amorces spécifiques, les régions flanquantes de la séquence connue. Trois amorces spécifiques ont été définies, dont deux (amorce 1 et amorce 2) sont situées vers l'extrémité 5' et la dernière (amorce 3) située du côté 3' du fragment de 616 pb déjà obtenu (figure 4). Après clonage du fragment amplifié et séquençage dans les deux sens de huit clones, une séquence nucléotidique de 1457 pb a été obtenue. Au sein de cette séquence, une région de 1239 pb, délimitée par un codon start ATG et par un codon stop TAA, pouvant correspondre à l'ADNc de la région codante, a ainsi pu être isolée (annexe 3). Cette séquence code une protéine de 412 acides aminés présentant des homologies avec des cyclines de type B1 d'autres espèces (*N. tabacum*, *Petunia hybrida*, *Catharantus roseus*, *Chenopodium rubrum*, *Glycine max*,... ; figure 5).

L'analyse précise a permis de mettre en évidence plusieurs motifs caractéristiques des cyclines de type B des différentes espèces végétales connues. Sur la figure 5, entre les positions 38 et 47, nous retrouvons le motif **RALGDIGNLV** correspondant à la « boîte de destruction ». Ce motif correspond au site de reconnaissance de l'ubiquitine pour permettre la protéolyse de la cycline. Ce site de reconnaissance est spécifique des cyclines mitotiques et n'a jamais été retrouvé chez les cyclines de type D. Deux autres boîtes, appelées respectivement boîte A et boîte B, dont les motifs respectifs sont **TRTFRAQL** et **LTARSKVAC**, sont situées entre les positions 72 et 79 et entre les positions 184 et 193 (figure 5). Ces deux boîtes sont présentes chez toutes les cyclines de type B1. Elles sont importantes pour la signalisation cellulaire de la protéine (Sun *et al.*, 1999b). Chez *C. intybus*, la boîte cycline s'étend du résidu 251 au résidu 409, et est également caractéristique des cyclines mitotiques : c'est le site d'accrochage de la CDK afin de former le complexe régulateur de la transition G2/M du cycle cellulaire. A l'intérieur de cette boîte cycline, la présence d'un motif **HRKF** (positions 263 à 266), correspondant au motif général (H/Q)X(K/R/Q)(F/L) caractéristique des cyclines de type B, permet de définir au sein des cyclines mitotiques, les cyclines de type B des cyclines de type A (figure 5). L'ADNc isolé chez la chicorée correspond donc à un gène codant une cycline de type B.

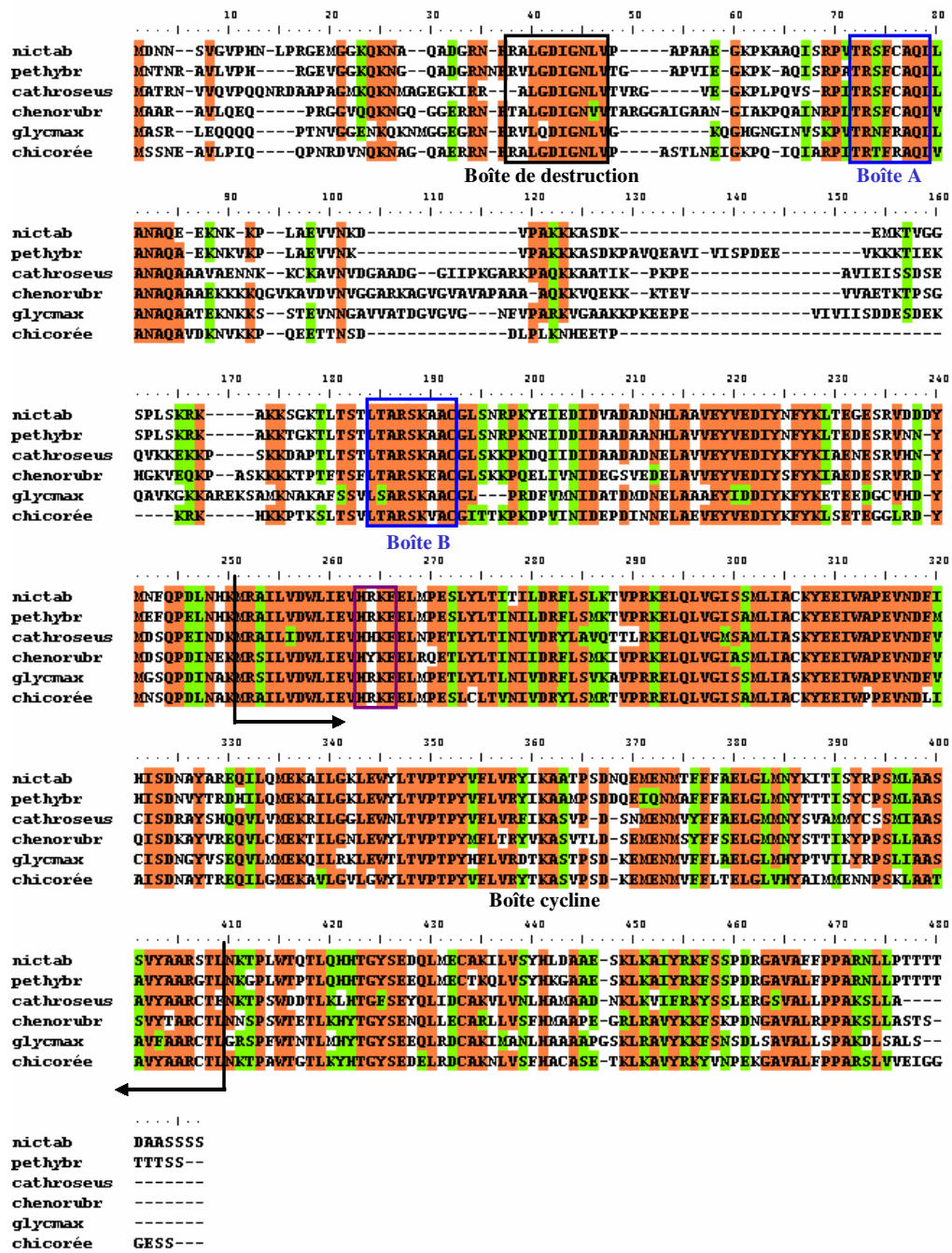


Figure 5 : Alignement de la séquence protéique déduite de la chicorée avec cinq séquences protéiques de cyclines de type B1 présentant le plus d'homologie. nictab: *Nicotiana tabacum*, pethybr: *Petunia hybrida*, cathroseus: *Catharantus roseus*, chenorubr: *Chenopodium rubrum*, glycmay: *Glycine max*. Les acides aminés identiques pour minimum cinq des six séquences sont surlignés en rouge. Les acides aminés similaires sont surlignés en vert. La séquence cycB1 de chicorée est caractérisée comme les autres par la présence de la boîte de destruction (cadre noir), des boîtes A et B (cadres bleus) et de la boîte cycline (entre les flèches). Le cadre violet représente le motif (H/Q)X(K/R/Q)(F/L) caractéristique des cyclines de type B.

3. Etude de l'expression du gène *cycB1* de chicorée dans des suspensions cellulaires par la technique de RT-PCR semi-quantitative en temps réel

Nous possédons, au laboratoire, des suspensions cellulaires de chicorée qui ont été initiées à partir de cals provenant d'explants racinaires de *C. intybus* L. var. Witloof (Dubois *et al.*, 1988). Ces suspensions cellulaires sont maintenues en croissance permanente, par le repiquage tous les 14 jours sur un milieu neuf. Legrand (2000) a réalisé des courbes de croissance sur ces suspensions cellulaires de chicorée. Dans un premier temps, compris entre 2 et 8 jours après le repiquage sur milieu neuf, le nombre de cellules augmente de façon exponentielle. Autour du 10^{ième} jour, le nombre de cellules devient constant pour enfin chuter à partir du 14^{ième} jour. Ces suspensions cellulaires, qui sont en croissance permanente, sont un matériel intéressant afin d'étudier l'expression de gènes contrôlant le cycle cellulaire.

3.1 Etude de l'expression de la cycline B1 de chicorée au cours du cycle cellulaire

Afin d'étudier l'expression de la cycline B1 au cours du cycle cellulaire, nous avons utilisé des suspensions cellulaires qui se trouvent en phase exponentielle de croissance, 5 jours après le repiquage sur un milieu neuf. Les divisions ont été bloquées au niveau de la transition G1/S par l'hydroxyurée, qui inhibe l'activité de la ribonucléotide diphosphate réductase, et en phase M par l'oryzaline, qui inhibe la polymérisation des microtubules. L'expression de la cycline B1 a été mise en évidence, dans ces cellules bloquées, par la technique de RT-PCR semi-quantitative en temps réel. Cette technique consiste en un dosage relatif des ARNm d'un gène cible par rapport aux ARNm d'un gène témoin de normalisation. Il nous a donc fallu dans un premier temps choisir et isoler un gène pouvant servir de témoin de normalisation.

De nombreux travaux utilisant différentes techniques (Northern blot, RT-PCR semi-quantitative, PCR temps réel) sur différentes espèces végétales et relatant l'expression de gènes contrôlant le cycle cellulaire, font référence au gène codant l'actine2 (Dewitte *et al.*, 2003; De Veylder *et al.*, 2001;...). Nous avons donc entrepris d'isoler un fragment d'un gène codant une actine de chicorée. Les séquences des gènes codant les actines de différentes espèces étant très largement conservées, la définition d'un couple d'amorces dégénérées d'une région de ce gène a été aisée. Deux amorces dégénérées, nommées AF3 et AR2, ont été définies à l'aide du logiciel Codehop sur le site <http://blocks.fhcrc.org/codehop.html>. Leurs séquences sont :

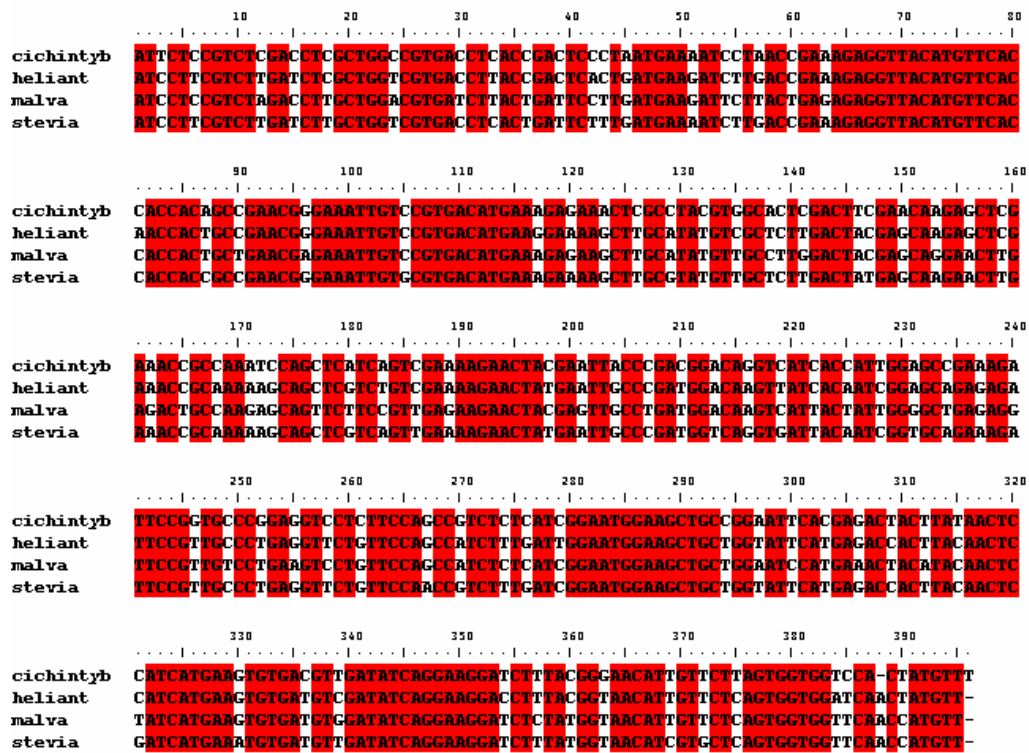


Figure 6 : Alignement de séquences nucléotidiques de gènes actine de chicorée et de trois autres espèces végétales. Heliant: *Heliantus annuus* (Asteracées), malva: *Malva pusilla* (Malvacées), stevia: *Stevia rebaudiana* (Astéracées). Les nucléotides identiques pour les quatre séquences sont surlignés en rouge.

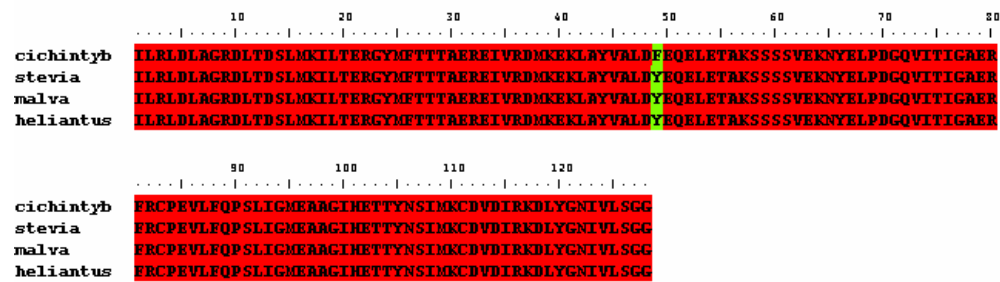


Figure 7 : Alignement de la séquence en acides aminés déduite de chicorée par rapport aux séquences actine d'autres espèces végétales. Heliantus: *Heliantus annuus*, malva: *Malva pusilla*, stevia: *Stevia rebaudiana*. Les acides aminés identiques pour les quatre séquences sont surlignés en rouge. Les acides aminés similaires sont surlignés en vert.

AF3 5'-GAGATGGAGTTTCTCATACTGTTCTTATHAYGARGG-3'

AR2 5'-AGACATTCTATCAGCAATTCCAGGRAACATNGT-3'

où N=A, C, G ou T H=A ou C Y=C ou T R=A ou G

Le nombre total de dégénérescences est égal à 8 pour les deux amorces.

Après optimisation de la technique PCR concernant la durée et la température d'hybridation ainsi que la durée d'élongation, un fragment de 396 pb qui présente 75% d'homologie avec des gènes d'actine d'autres plantes a été isolé à partir d'ADNc issus de suspensions cellulaires (figure 6). Les conditions d'amplifications ont été les suivantes :

5 minutes à 92°C
30 X { 1 minute à 94°C
45 secondes à 58°C
1 minute à 72°C
10 minutes à 70°C

La séquence protéique déduite, composée de 128 acides aminés, présente 99% d'identité et 100% de similarité avec les actines d'*Héliantus annuus* (Astéracées), *Stevia rebaudiana* (Astéracées) et *Malva pusilla* (Malvacées) (figure 7). Cette séquence d'actine de chicorée a permis la définition d'un couple d'amorces spécifiques afin d'utiliser ce gène comme témoin de normalisation lors des expériences de RT-PCR semi-quantitative en temps réel.

Deux inhibiteurs de divisions cellulaires, l'oryzaline et l'hydroxyurée, ont été rajoutés séparément au milieu de culture des cellules. Les variations des quantités relatives d'ARNm de la cycline B1 de chicorée permettront de positionner l'expression de cette cycline au cours du cycle cellulaire. Les concentrations en inhibiteurs ainsi que les durées de traitement sont basées sur des travaux réalisés avec les cellules BY2 de tabac (Planchais *et al.*, 2000).

Le traitement des suspensions cellulaires, 5 jours après le repiquage sur un milieu neuf, par l'oryzaline 15 µM pendant 24 heures, n'a pas d'effet significatif sur la quantité relative d'ARNm de la cycline B1 de chicorée (figure 8). Par contre l'ajout, à ce même stade, d'hydroxyurée 15mM pendant 24 heures entraîne une forte diminution de la quantité d'ARNm (figure 8). En effet, après le blocage de la division cellulaire par l'hydroxyurée lors de la transition G1/S du cycle cellulaire, la quantité relative d'ARNm de la cycline B1 est diminuée de 45 fois. La cycline B1 de chicorée semble donc être exprimée après la transition G1/S du cycle cellulaire et avant la phase M. Ces résultats confirment l'appartenance de cette cycline au groupe des cyclines mitotiques B1. La cycline isolée chez la chicorée serait donc

bien une cycline mitotique, essentielle à la transtion G2/M du cycle cellulaire. En accord avec la nouvelle nomenclature des gènes contrôlant le cycle cellulaire proposée par Renaudin *et al.* (1996) ainsi qu'en fonction des caractéristiques attribuées aux cyclines de type B1, nous proposons de nommer le premier gène codant une cycline isolé chez la chicorée, Ci;CycB1;1.

3.2 Expression de Ci;CycB1;1 au cours de la cinétique de croissance de suspensions cellulaires de chicorée

La quantité relative d'ARNm Ci;CycB1;1 a été observée au cours de la cinétique de croissance des cellules de chicorée. Nous avons choisi pour ces études quatre points de la cinétique : deux au sein de la phase exponentielle de croissance, 2 et 5 jours après le repiquage, un lors de la phase stationnaire, 10 jours après le repiquage et le dernier lors de la diminution du nombre de cellules, 17 jours après le repiquage. Les premiers résultats de ces expériences, répétées trois fois sur une même synthèse d'ADNc, sont présentés dans la figure 9.

Au cours de la cinétique de division des suspensions cellulaires de chicorée, la quantité relative d'ARNm de la cycline B1 reste constante entre J+2 et J+5 (figure 9). A ces moments, les cellules sont en phase exponentielle de croissance. La quantité relative d'ARNm de Ci;CycB1;1 chute de 2/3 à J+10 par rapport à J+2 et J+5 (figure 9). A ce stade, les cellules sont en phase stationnaire caractérisée par un équilibre entre le nombre de division et le nombre de mort cellulaire. Enfin, au 17^{ième} jour après repiquage des cellules, une diminution de plus de dix fois de la quantité relative d'ARNm a été observée (figure 10). A ce stade, les cellules ne se divisent plus et meurent. La quantité relative des ARNm de Ci;CycB1;1 semble donc varier de manière similaire par rapport aux taux de divisions dans les suspensions cellulaires de chicorée. Ci;CycB1;1 semble donc être exprimée préférentiellement dans les cellules en division.

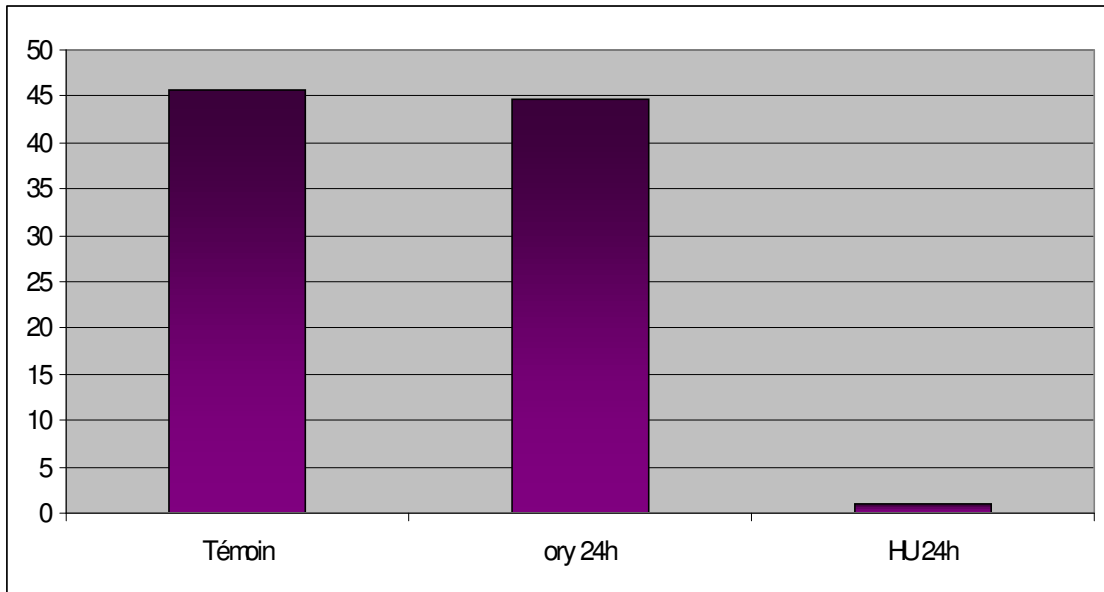


Figure 8 : Quantités relatives, par rapport à l'actine, des ARNm de la cycline B1 de chicorée dans des suspensions cellulaires de chicorée bloquées par des inhibiteurs de division cellulaire. Témoïn: sans inhibiteur, ory 24h: oryzaline 15 μ M pendant 24 heures, HU 24h: hydroxyurée 15 mM pendant 24 heures. La valeur arbitraire égale à 1 a été donnée à la quantité relative la plus faible

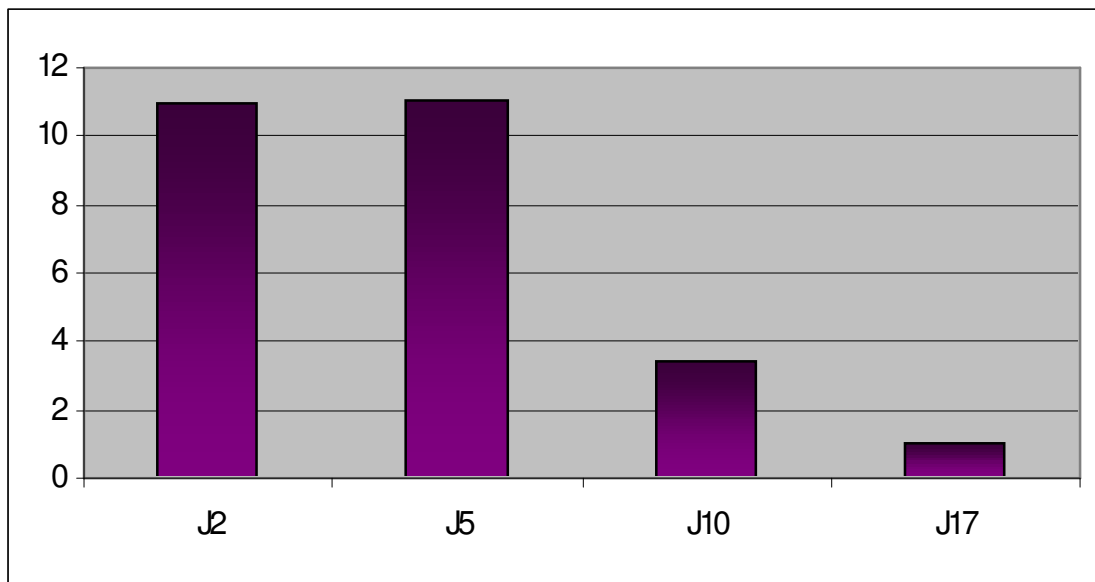


Figure 9 : Valeurs relatives, par rapport à l'actine, des quantités d'ARNm de la cycline B1 de chicorée dans des suspensions cellulaires en culture. La valeur arbitraire égale à 1 a été donnée à la quantité relative la plus faible. Les ARNs ont été isolés 2, 5, 10 et 17 jours après le repiquage des cellules sur un milieu neuf.

DISCUSSION

Les résultats présentés dans les chapitres I et II ont été obtenus par le biais de l'étude de l'activité de promoteurs de gènes contrôlant le cycle cellulaire d'*A. thaliana* dans un système hétérologue qu'est la chicorée. Des constructions pCycB1;1-*uidA* et pCycA2;1-*uidA* ont été introduites dans la chicorée. L'activité de ces promoteurs a été étudiée lors du développement racinaire par le biais de tests histochimiques GUS. Bien que cette technique ait été employée dans d'innombrables travaux, elle présente à nos yeux plusieurs inconvénients. *A. thaliana* est une plante qui présente un cycle de vie court : huit semaines de graine à graine. La reproduction se fait facilement par autogamie. La chicorée de Bruxelles que nous utilisons est une plante bisannuelle. Son cycle de vie de graine à graine demande deux ans dans des conditions de cultures normales. Cependant, en conditions contrôlées, cette durée peut être diminuée de moitié. La chicorée répond en outre beaucoup moins bien à l'autofécondation avec un rendement de graines aléatoire et pouvant être très faible. De plus, l'étude de l'activité d'un promoteur demande préalablement un événement de transgénèse suivit de la régénération de plantules transformées. Afin d'augmenter le pourcentage de plantes transformées et ainsi stabiliser génétiquement l'insertion du transgène, les études ont été réalisées sur des plantes de deuxième génération.

Ces différentes raisons nous ont amené à isoler et à caractériser des gènes contrôlant le cycle cellulaire chez la chicorée. A l'heure actuelle, nous avons obtenu la séquence codante complète de la cycline B1;1 de chicorée (Ci;CycB1;1), mais nous possédons aussi des séquences homologues à des CDKs et à une KRP (Legrand, 2002).

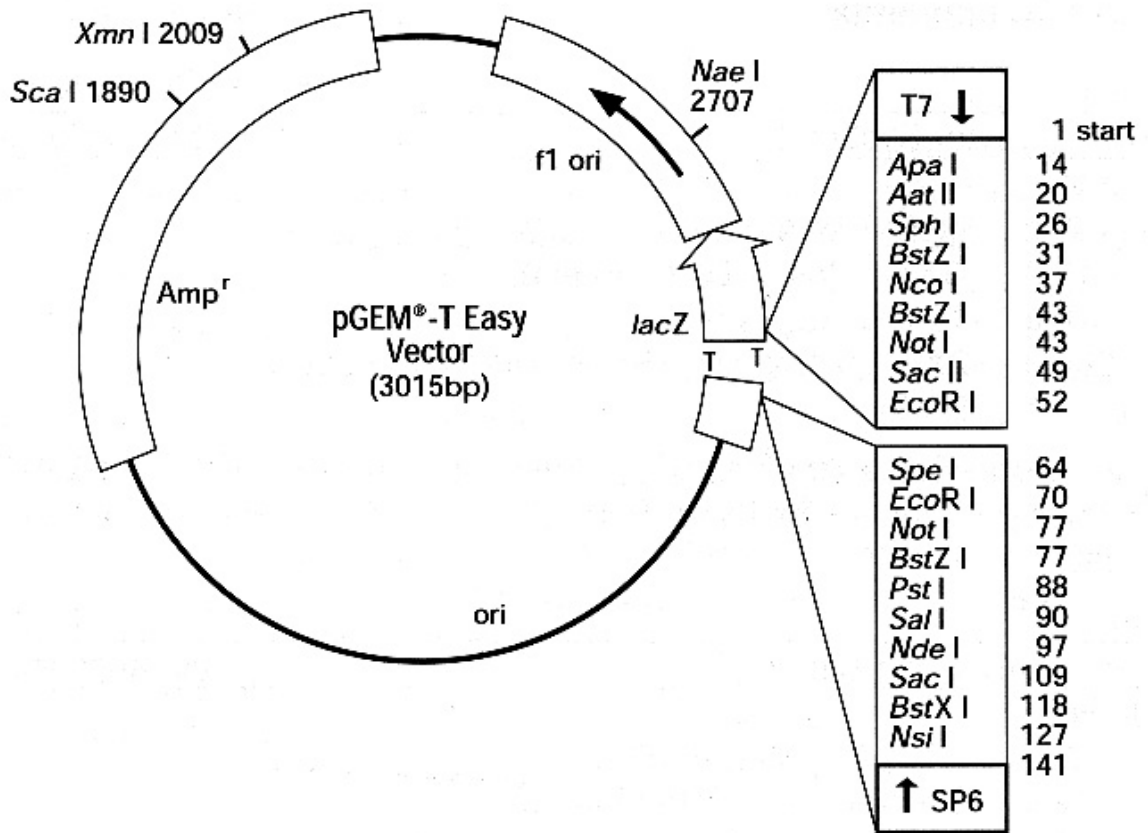
Le gène codant une cycline de type B1, isolé et partiellement caractérisé ici, présente une forte homologie de séquence protéique avec des cyclines de même type déjà isolées chez d'autres espèces végétales. Les motifs caractéristiques des cyclines de type B ont été retrouvés au niveau de la séquence protéique chez la chicorée. Au sein de la boîte cycline, la présence d'un motif **HXKF**, spécifique des cyclines B, permet de différencier les cyclines mitotiques A et B. En plus de la boîte de destruction et de la boîte cycline, il existe chez toutes les cyclines de type B1, deux boîtes appelées boîte A et boîte B. Ces deux boîtes sont importantes pour la signalisation cellulaire de la protéine (Sun *et al.*, 1999b). La boîte A, présente sur le gène Ci;CycB1;1 et dont le motif est **TRXFXAQL**, a été décrite chez les animaux comme étant capable de se lier spécifiquement à la protéine CMR1 qui permet le transport d'autres protéines du noyau vers le cytoplasme (Yang *et al.*, 1998).

Les expériences de RT-PCR semi-quantitatives en temps réel apportent des résultats devant être considérés comme des résultats préliminaires. En effet, ces expériences n'ont été réalisées qu'à partir d'une seule synthèse d'ADNc. Cependant, ils sont tout à fait en accord avec ce qui a déjà été décrit chez d'autres plantes. En effet, Ferreira *et al.* (1994) présentent la cycline B1;1 d'*A. thaliana* comme étant une cycline qui s'exprime lors de la transition G2/M dans les cellules en division ou réactivées pour entrer dans le cycle cellulaire. Afin de caractériser la ou les phases du cycle cellulaire durant lesquelles la cycline B1;1 de chicorée est exprimée, des cellules de chicorée en suspension ont été traitées avec deux inhibiteurs du cycle cellulaire. L'oryzaline a la capacité de bloquer les cellules lors de la phase M du cycle cellulaire alors que l'hydroxyurée bloque les cellules lors de la transition G1/S. Nos premiers résultats montrent d'une part, que l'oryzaline n'a aucun effet sur la quantité relative des transcrits et que, d'autre part, le traitement par l'hydroxyurée entraîne une baisse de près de 50 fois des quantités relatives des transcrits. Cette cycline semble donc être préférentiellement exprimée après la transition G1/S et avant la mitose. Elle présente une expression semblable aux cyclines mitotiques d'autres espèces végétales. Enfin, d'après le calcul des quantités relatives des ARNm de Ci;CycB1;1 au cours de la cinétique de croissance des suspensions cellulaires, son expression peut être aisément corrélée aux divisions cellulaires. En effet, une diminution de plus de dix fois de la quantité des transcrits est observée lorsque les cellules ne se divisent plus.

Annexes

- Annexe 1 -

Carte de restriction du vecteur de clonage pGEM[®]-T easy vector (Promega)



- Annexe 2 -

Alignements de la séquence en acides aminés déduite de *C. intybus* avec les séquences en acides aminés de cyclines de type B1 de différentes espèces. Les séquences d'ADNc obtenues par séquençage ont été soumises à une traduction selon les 6 cadres de lecture possibles sur le site internet : www.expasy.ch. La séquence en acides aminés qui ne présente pas de codons stop a été soumise aux banques de données. Les résultats suivants présentent les cinq espèces végétales avec lesquelles les homologies de séquence sont les plus importantes.

tr	Q9LD02	Cyclin B1 [CYCB1] [Nicotiana tabacum (Common tobacco)]	425 AA align
Score = 234 bits (597), Expect = 5e-61 Identities = 136/217 (62%), Positives = 160/217 (73%), Gaps = 16/217 (7%)			
Query: 1	RNRRALGDIGNLVPASTLNEIGKPQI-QIARPITRTFRAQLVANAQAVDKNVKKPQEETT	59	
Sbjct: 29	RNRRALGDIGNLVPA GKP+ QI+RP+TR+F AQL+ANAQ +KN KKP E	84	
Query: 60	NSD-----DLPLKNHEETP--KRKHKKPTKSLTSVLTARSKVACGITTTPKDPVINI	109	
Sbjct: 85	N D D +K +P KRK KK K+LTS LTARSK ACG++ +PK + +I	144	
Query: 110	DEPDINNELAEVEYVEDIYKFYKLSETEGGLRD-YMNSQPDLNAKMRAILVDWLVIEVHRK	168	
Sbjct: 145	D D +N LA VEYVEDIY FYKL+E E + D YMN QPDLN KMRAILVDWLVIEVHRK	204	
Query: 169	FELMPESLCLTVNIVDRYLSMRTVPRRELQLVGISAM	205	
Sbjct: 205	FELMPESL LT+ I+DR+LS++TVPR+ELQLVGIS+M	241	

tr	Q9SBO4	CYCB1-1 protein [CYCB1-1] [Petunia hybrida (Petunia)]	437 AA align
Score = 234 bits (597), Expect = 5e-61 Identities = 132/229 (57%), Positives = 160/229 (69%), Gaps = 27/229 (11%)			
Query: 2	NRRALGDIGNLVPASTLNEIGKPQIQIARPITRTFRAQLVANAQAVDKNVKKPQEETTNS	61	
Sbjct: 29	NRR LGDIGNLV + + E GKP+ QI+RP TR+F AQL+ANAQA +KN KP E N	86	
Query: 62	-----DDLPLKNHEETP--KRKHKKPTKSLTSVLTARSKVAC	96	
Sbjct: 87	+++ K E++P KRK KK K+LTS LTARSK AC	146	
Query: 97	GITTTPKDPVINIDEPDINNELAEVEYVEDIYKFYKLSETEGGLRDYMNQPDNAKMRA	156	
Sbjct: 147	G++ +PK+ + +ID D N LA VEYVEDIY FYKL+E E + +YM QP+LN KMRA	206	
Query: 157	ILVDWLVIEVHRKFELMPESLCLTVNIVDRYLSMRTVPRRELQLVGISAM	205	
Sbjct: 207	ILVDWLVIEVHRKFELMPESL LT+NI+DR+LSM+TVPR+ELQLVGISAM	255	

tr [004389](#) **B-like cyclin [CYM] [Catharanthus roseus (Rosy periwinkle) (Madagascar periwinkle)]** 436
AA [align](#)

Score = 216 bits (549), Expect = 2e-55
Identities = 123/236 (52%), Positives = 158/236 (66%), Gaps = 36/236 (15%)

Query: 3 RRALGDIGNLVPA^{STLNEIGKPQIQIARPI}TRTFRAQLVANAQA----- 46
RRALGDIGNLV + GKP Q++RPITR+F AQL+ANAQA
Sbjct: 33 RRALGDIGNLVTVRGVE--GKPLPQVSRPITRSFCAQLLANAQA^{AAVAEN}KKCKAVNV 90
Query: 47 -----VDKNVKKPQEETTNSDD-----LPLKNHEETPKRKHKKPTK----SLTSVLT 89
+ K +KP ++ + + + + E K K KKP+K +LTS LT
Sbjct: 91 GAADGGIIPKGARKPAQKKAATIKPKPEAVIEISSDSEQVK-KEKKPSKKDAPTLTSTLT 149
Query: 90 ARSKVACGITT^{KPKDPVINIDEPDINN}ELAEVEYVEDIYKFYKLS^{ETEGGLRDY}MNSQPD 149
ARSK ACG++ KPKD +I+ID D +NELA VEYVEDIYKFYK++E E + +YM+SQP+
Sbjct: 150 ARSKAACGLS^{KPKDQIIDIDAADADNELAV}VEYVEDIYKFYKIAENESRVHNYMDSQPE 209
Query: 150 LNAKMRAILVDW^{LIEVHRKFELMPESL}CLTVNIVDRYLSMRTVPRRELQLVGISAM 205
+N KMRAIL+DWLIEVH KFEL PE+L LT+NIVDRYL+++T R+ELQLVG+SAM
Sbjct: 210 INDKMRAILIDW^{LIEVHHKFELNPETLYLT}INIVDRYLAVQTTLRKELQLVGM^{SAM} 265

tr [P93102](#) **Mitotic cyclin [CYC1] [Chenopodium rubrum (Red goosefoot) (Pigweed)]** 446
AA [align](#)

Score = 211 bits (536), Expect = 6e-54
Identities = 129/248 (52%), Positives = 158/248 (63%), Gaps = 45/248 (18%)

Query: 1 RNRALGDIGNLVPA-----STLNEIGKPQIQIARPI^{TRTFRAQLVANAQA}----- 46
RNR ALGDIGN+V A N I KPQ I RP+TR+F AQLVANAQA
Sbjct: 26 RNRTALGDIGNVVTARGGAIGAANGIAKPQA-INRPLTRSFC^{AQLVANAQAAA}EKKKKQ 84
Query: 47 ---VDKNV-----KPKQE----ETTNSDDLPLKNH---EETPKRKH 77
VD NV KK QE E ++ H E+ P K
Sbjct: 85 VKAVDVNVGGARKAGVGVAVAPAAAAQKKVQEKKKTEVVVAETKTPSGHGKVEQK^{PASKK} 144
Query: 78 KKPTKSLTSVLTARSKVACGITT^{KPKDPVINIDEPDINN}ELAEVEYVEDIYKFYKLS^{ETE} 137
KK T + TS LTARSK ACG++ KP++ ++NIDE + +ELA VEYVEDIY FYK++E E
Sbjct: 145 KK-TPTFTSFLTARSKEACGLS^{KPKQELIVNIDEGSVEDE}LAVVEYVEDIYSFYKIAEDE 203
Query: 138 GGLRDY^{MNSQPD}LNAKMRAILVDW^{LIEVHRKFELMPESL}CLTVNIVDRYLSMRTVPRREL 197
+RDYM+SQPD+N KMR+ILVDW^{LIEVH} KFEL E+L LT+NI+DR+LSM+ VPR+EL
Sbjct: 204 SRVRDY^{MDSQPD}INEKMR^{SILVDW}LIEVHYKFELRQETLYLTINI^{IDRFLSMKIVPR}KEL 263
Query: 198 QLVGISAM 205
QLVGI++M
Sbjct: 264 QLVGIASM 271

chenopodium rubrum AGACAGCTTTAGGAGACATTGGAAACGTACTCACTGCAGGAGGAGGAGCA
glycine max AGAACA--GAAGGGTGCTGCAA----CATATTGGGAATCTCTGGGT

60 70 80 90 100

Cichorium intybus GCTTCCACTCTTAATGAAATAAGAAAGCCCCAAA---TTCAAA---TAGC
nicotianna tabacum G-----CTCCTGCTGCAGAAAGAAAGCCTAAAGCAGCTCAGA---TTTC
petunia hybrida GGT---GCTCCTGTTATAGAAAGAAAGCCTAAAG---CTCAGA---TTTC
catharantus roseus G-----TTCGTGGAGTTGAAAGCAAACCTCTTC---CTCAGG---TTTC
chenopodium rubrum A-----TTGGCGCTGCTAATGCTATTGCTAAAC---CCCAGGCAAACAA
glycine max A-----AACAAAGCCATGCAAA---TGGAA---TTAACG---TGTC

110 120 130 140 150

Cichorium intybus -TCGTCCTCATCACACAACTTTCCGAGCCCAACTGGTGGCAATGCTCAA
nicotianna tabacum -TCGCCTGTGACTAGGAGCTTTTGTGCACAGTTGCTAGCTAATGCACAA
petunia hybrida -TCGTCCTGTGACTAGGAGCTTTTGTGCACAGTTGCTGGCTAATGCACAA
catharantus roseus -TCGTCCTATTACTAGGAGTTTCTGTGCACAGTTGCTGGCAATGCACAA
chenopodium rubrum -CCGTCTCTCACCAAGAGTTTTCGCGCAGTTAGTCGCAATGCACAA
glycine max -TAAACCTGTCAAAAGAACTTCGTCTCACTATTGGCCAAATGCACAA

160 170 180 190 200

Cichorium intybus GCTGTA--GACAAAAATG-----TAAAGAAA-----CCA-
nicotianna tabacum GAAGAGA-AGACAAG-----AAACC---ACTAGCAGAAG-----TTGT
petunia hybrida GCAGAGA-AGACAAGGTG--AAACC---GCTTGCAGAAG-----TTGT
catharantus roseus GCAGCAGCACTAGCTGAGAATAA--TAAGAAATGTAAG-----GCCGT
chenopodium rubrum GCAGCTGCTGAGAAAAAGAAGAAACAAGGAGTGAAAGCTGTG--GATGT
glycine max GCCCAACAGAAAAGAATAAGAAATCAAGCACTGAAGTGA-----ACAA

210 220 230 240 250

Cichorium intybus CAAGAAGA---AACACAAACAGTGACGAT-T-----TACCCCTG
nicotianna tabacum CAATAAAGATGTACCAGCCA--GAAGAAGGCAT-----CAGATAAG
petunia hybrida CAATAAAG---TACCAGCCA--GAAGAAGGCAT-----CAGATAAG
catharantus roseus TAATGTGGATGGAGCTGCGGATGGAGGTATTA-----TACCTAAA
chenopodium rubrum TAATGTGGTGGCGCAGAAA--GGCAGGAGTAGGA-----GTAGCAGTA
glycine max CCGGAGCAGTGGTGGCAACTGATGGGGTTGGTGTGGGAATTTGTTCCTG

260 270 280 290 300

Cichorium intybus -----
nicotianna tabacum -----
petunia hybrida CCTGCT--GTACAAGAAGCTGTTATTG-TCATA--A-----GCC
catharantus roseus GGAGCAAG--AAAACCAGCTCAGAAGA-AAGCT---GCTACTATCAAGC
chenopodium rubrum GCACCA--GCAGCAGCAGCACAGAAA--AGGTGCAAGAAAAGAAGAAAAC
glycine max CTAGAAAGGTGGGAGCAGCTAAGAAGCCTAAAGAAGAACCTGAAGTGATT

310 320 330 340 350

Cichorium intybus -----
nicotianna tabacum -----GAAGAAA-
petunia hybrida -----GAAATGARGACTGTT-----GGGGGAA
catharantus roseus CTGATG--AAGAAGTTAAGAGAAAGCCATT-----GAGAAAA
chenopodium rubrum CTAAGC--CTGAAGCTGTTATTGAAATTAGTTCTGATTCT--GAGCAAGT
glycine max TGAAGTGGTTGTAGCAGAAACTAAAACCCCTTCTGGACAT--GGGAAAGT
GTGATTATCTCTGATGATGATCAGACGAAAAGCAAGCTGTGAAGGGAAA

360 370 380 390 400

Cichorium intybus -----
nicotianna tabacum ---CCCCA---AAAAGAAAACATAAAAACCACCAAGTCTCTCACCTC
petunia hybrida GTCCATTGAGCAAAAGAAAAGCAAGAAGTC-TGGAAAGACTCTCACTTC
catharantus roseus GTCCCTTGAGCAAAAGAAAAGCAAGAAGAC-TGGAAAGACTCTCACTTC
chenopodium rubrum TAAGAAGGAAAAAAACCAGCAAAAAGA--TGCCCAACTCTCACCTC
glycine max TGAACAAAAACCAGCATCTAAGAAGAAAGAA--AACCCCAACCTTTACTTC
AAAGGCAAGGGAAAATCTGCCATGAAGAA--TGCCAAGGCCTTCAGTTC

410 420 430 440 450

Cichorium intybus TGTCCTCACCGCTCTGAGTAAGGTGGCTTGTGGGATAACAACAAAACCCA
nicotianna tabacum TACTCTCACTGCTAGCAAGCAAGGCTGCTTGTGGACTTTCCAATAGACC
petunia hybrida TACCCTCACTGCAAGAAGCAAGGCTGCTTGTGGACTTTCCAATAGGCCTA
catharantus roseus GACTCTTACTGCTCGAAGCAAGGCTGCTTGTGGATTGAGCAAGAAAACGA
chenopodium rubrum TTTCTCACCGCCCTAGCAAGGAAGCTTGTGGACTGTCCAAGAAAACCTC
glycine max TGTTCTCTCTGCTAGCAAGCAAGGCTGCTTGTGGACT-T-----CCAA

460 470 480 490 500

.....|

490 500 510 520 530 540
chicintyb AAGTCTCTCACCCTCTGTCCTCACCGCTCGTAGTAAGGTGGCTTGTGGATAACAA CAAAA
nictab AAGACTCTCACTTCTACTCTCACTGCTAGAAGCAAGGCTGCTTGTGGACTTTCCAATAGA
pethybr AAGACTCTCACTTCTACCCTCACTGCAAGAAGCAAGGCTGCTTGTGGACTTTCCAATAGG
cathroseus CCAACTCTCACCCTCGACTCTTACTGCTCGAAGCAAGGCTGCTTGTGGATTGAGCAAGAAA
chenoprubr CCAACCTTTACTTCTTTCCTCACCGCCGCTAGCAAGGAAGCTTGTGGACTGTCCAAGAAA
glymax AAGGCCTTCAGTTCTGTTCTCTCTGCTAGAAGCAAGGCTGCTTGC GGACTT-----

550 560 570 580 590 600
chicintyb CCCAAAGATCCAGTAAATCAACATAGACGAACCCGACATCAACAA CGAACTAGCCGAAATC
nictab CCAAAGTATGAGATTGAGGACATCGATGTCGCTGATGCTGATAATCATTTGGCTGCTGTA
pethybr CCTAAGAATGAGATTGATGATATTGATGCTGCAGACGCTGCTAACCATTTGGCTGTTGTA
cathroseus CCGAAGGACCAGATAATTGATATTGATGCTGCTGACGCAGATAATGAGTTGGCTGTTGTT
chenoprubr CCTCAAGAACTAATAGTAAACATTGATGAGGGGAGCGTAGAAGATGAATTTGGCAGTTGTT
glymax CCAAGGGATTTTGTGATGAACATTGATGCAACTGACATGGACAATGAATTTGGCAGCAGCC

610 620 630 640 650 660
chicintyb GAATACGTAGAAGACATCTACAAATTTCTACAAACTCTCAGAAACC GAAGCCGATTTACGC
nictab GAGTATGTTGAGGATATCTACAACCTTCTACAAGCTCACTGAGGGTGAAAGTCGAGTGGAT
pethybr GAGTATGTTGAAGACATCTACAATTTCTATAAGCTCACTGAGGACGAAAGTCGAGTGAAT
cathroseus GAATATGTTGAAGATATCTACAATTTCTACAAGATTGCTGAGAACGAAAGCCGAGTGCAC
chenoprubr GAGTATGTTGAGGACATTTACAGCTTCTACAAATTTGCTGAGGACGAGATTCGAGTCCGC
glymax GAGTACATCGATGATATCTACAATTTTACAAAGAGACTGAAGAAGATGTTTGTGTGCAT

670 680 690 700 710 720
chicintyb GAC---TACATGAACCTCAACCCGATCTAAACGCCAAAATGCGAGCCATTTTACTGAC
nictab GACGACTACATGAACCTTTCAACCAGACCTGAATCATAAGATGAGAGCCATTTTACTGGAC
pethybr AAC---TACATGGAATTCCAACCAGACCTGAATCATAAGATGAGAGCCATTTTGTGGAC
cathroseus AAT---TACATGGATTTCGCAACCAGAGATAAATGATAAATGAGGGCAATTTGATTTGAT
chenoprubr GAT---TACATGGATTTCGCAACCAGATCAATGAGAAGATGAGGCTATTCTACTGATGAT
glymax GAC---TACATGGGTTTCGCAACCAGATATTAATGCCAAGATGAGGTCATCCTTGTGGAC

730 740 750 760 770 780
chicintyb TGGTTAATCGAAGTTTACCGAAAATTCGAACCTCATGCCCGAAAGTCTTTGCTCAGGGTC
nictab TGGTTAATAGAAGTTTACAGGAAAATTTGAGCTTATGCCGAGAGCCTTTACCTTACAATTT
pethybr TGGTTGATAGAAGTTTACAGGAAAGTTTGAAGCTGATGCCGAAAGCCTTTACCTTACTATT
cathroseus TGGTTAATTTGAAGTTTATCACAAAATTTGAACCTTAATCCAGAGACACTTTACCTCACTATC
chenoprubr TGGTTAATTTGAAGTGCATTACAAGTTTGAAGTTGAGGCAAGAGACACTTTACCTTACCATA
glymax TGGTTGATAGAAGTGCATAGGAAGTTTGAAGCTCATGCCAGAAACTCTTTATTTGACCTTG

790 800 810 820 830 840
chicintyb AACATCGTTGACCGATACCTTTCCATGAGAACCCTACCCCGAAGAGAACTCCAAC TTTG
nictab ACCATACTGGACCGTTTTCCTCTCGCTGAAGACGGTTC AAGGAAGGAACCTTCAGTTAGTT
pethybr AACATACTAGACCGTTTCTCTCATGAAGACGGTTC CAGGAAGGAACCTTCAGTTAGTT
cathroseus AACATTGTTGATCGATATTTGGCTGTTC AACCACACTAAGGAAGAGCTTCAATTAGTAA
chenoprubr AACATCATCGATCGCTTTCCTTTGATGAAGATTGTC CCTAGGAAGAGCTTCAGTTGSTA
glymax AACATTGTCGATCGGTTTCCTGTCTGTGAAGGCTGTGCCTAGAAGGAGCTTCAGCTGSTT

850 860 870 880 890 900
chicintyb GGTATCAGTGC AATGTTGATTGCGTGTAAAATATGAAGAAATTTGGCCACCTG AAGTTAAT
nictab GGCATTAGCTCAATGCTAATTTGCTTGCAAGTATGAAGAGATTTGGGCACCAGAGGTGAAT
pethybr GGCATTAGCGCAATGCTAATTTGCTTGCAAGTATGAAGAGATTTGGGCACCAGAGGTCAAT
cathroseus GGAATGAGTGCATATGCTTATAGCTTCTAAAATATGAAGAAATTTGGGCTCCAGAGGTGAAT
chenoprubr GGCATTGCCTCAATGCTTATAGCTTGCAAGTATGAAGAAATTTGGGCACCTGAGGTGAAT
glymax GGCATCAGCTCCATGCTGATAGCTCAAAAATATGAAGAGATATGGGCACCAGAGGTAAAT

910 920 930 940 950 960
chicintyb GATTTGATCGCGATATCGGATAACCGTACACGAGAGAACAGATTTTGGGAATGGAGAAA
nictab GATTTCAATCATATATCAGACAATGCATATGCCAGAGAGCAAATACTTCAGATGGAGAAA
pethybr GATTTCAATCATATATCAGACAATGTGTATACCAGAGATCATATACTTCAGATGGAGAAA
cathroseus GACTTTGTATGCATCTCAGACAGAGCTTATAGTCACCAGCAGGTTTGGTTATGGAGAAA
chenoprubr GATTTTGTACAGATATCAGACAAGGCATATGTGAGAGAACAGTATTGTGTATGGAGAAA

glymax **GACTTTGTGTGCATATCAGACAATGGTTATGTTAGTGAACAAGTATGATGATGGAGAAA**

970 980 990 1000 1010 1020

chicintyb **GCGGTTCTTGGTGTGTTGGGGTGGTATTTGACCGTTCGACTCCGATGTTGTTCTTGTT**
nictab **GCAATTCCTGGGAAGTTGGAATGGTATTTGACAGTTC AACACCATATGTTTCTTGSTT**
pethybr **GCAATTCCTGGGAAGCTGGAATGGTATCTGACAGTTC AACACCATATGTTTCTTGSTT**
cathroseus **CGTATCTTGGGAGGACTTGAATGGAATTTAACAGTTC AACACCATATCGTTTCTTGSTT**
chenoprubr **ACAATACTTGGGAACCTGGAGTGGTATTTGACTGTTCCACACCATACATGTTCTTCACT**
glymax **CAAATCCTTAGGAAGCTTGAATGGACTTTAACAGTTC AACACCCATACACTTTTGTGTT**

1030 1040 1050 1060 1070 1080

chicintyb **CGGTACACGAAGGCTTCGGTTCCTTC---TGATAAAGAGATGGAGAAATATGGTGTTTTC**
nictab **AGGTACATTAAGCTGCAACACCATCTGATAATCAGGAGATGGAGAACATGACATTCCTT**
pethybr **AGGTACATCAAAGCTGCAATGCCATCTGATGATCAGGAGATACAGAACATGGCTTCTTC**
cathroseus **CGATTCATTAAGGCTCAGTTCC-----TGATTCAAATATGGAGAACATGGTATATTC**
chenoprubr **AGATATGTCAAAGCTTCTGTTACT---TGATTCTGAGATGGAAAATATGTCACTTC**
glymax **AGGGATACCAAAGCTCCACTCCGTC---TGACAAAGAGATGGAGAACATGGTGTTTTC**

1090 1100 1110 1120 1130 1140

chicintyb **TTGACTGAGTTGGGTTGGTTCATTACGCGATTATGATGGAGAAATATCCTTCGAAGCTT**
nictab **TTTGCTGAACTTGGTCTTATGAACTACAAGATCACAATATCATAACCGCCATCAATGCTA**
pethybr **TTTGCTGAACTTGGTCTTATGAACTATAACAATCACAATATCATACTGCCATCAATGCTA**
cathroseus **TTTGCTGAGCTTGGGATGATGAATATTCCGGTAGCGATGATGATTTGTTCAATGATT**
chenoprubr **TTTTCTGAACTTGGGATGATGAATATTCAACCACAATCAAGTACCTCCTCACTTCG**
glymax **CTTGCTGAACTTGGATTGATGATTACTCTACTGTAATCTTGACCGTCTTCTGATT**

1150 1160 1170 1180 1190 1200

chicintyb **GCTGCGACTGCGGTTTATGCTGCTCGGTGCACATTAATAAGACACCGGCTTGGACCGGG**
nictab **GCAGCATCGTCCGTTTATGCTGCTCGTAGCACTCTCAACAAAACCTCCATATGGACTCAA**
pethybr **GCAGCATCGTCTGCTATGCTGCTCGTGAACCTCTCAACAAAAGGCTCCTATGGACTCCA**
cathroseus **GCTGCTCAGCAGTTTATGCAGCAAGATGCACCTTAATAAGACCCCTTCTTGGGATGAT**
chenoprubr **GCCGCTTCGAGCGTGTACTGCTCGCTGACTCTGAAACAACAGTCCCTCTTGGACAGAA**
glymax **GCTGCTTCTGCTGTGTTTGGCGGCTCGATGTACCTTGGAGGAGCCCTTCTTGGACAAAC**

1210 1220 1230 1240 1250 1260

chicintyb **ACACTTAAATATCATACCGGGTATTCTGAAGATGAATTAAGGGATFGTGC AAAGAATCTG**
nictab **ACTCTGCAGCACCATACTGGCTACTCAGAAGATCAGTTGATGGAATFGTGC AAAGATATFG**
pethybr **ACTCTGCAGCACCATACTGGCTACTCAGAAGAGCAGTTGATGGAATGCACAAAGCAATFG**
cathroseus **ACATTGAAATTGCACACTGGTTTCTCTGAGTATCAGCTAATAGATFGTGC AAAGGTACTG**
chenoprubr **ACTCTCAAGCACTACACTGGCTACTCTGAAAACCAGCTTCTGGAGTGTGCTAGCCTATFG**
glymax **ACTTTGATGCACTACACAGGCTACTCTGAGGAGCAACTAAGGGATFGCCCAAATCATG**

1270 1280 1290 1300 1310 1320

chicintyb **GTGAGTTTTCATGCATGTGCAAGT---GAGACTAAGTTGAAGCGGTTGACAGAAAGTAT**
nictab **GTTAGTTATCACTTGGATGCTGCA---GAAAGTAAGCTGAAAGCAATTFACAGGAAGTTT**
pethybr **GTTAGCTATCACAAGGGTCTGCA---GAAAGTAAGCTCAAGGCAATTFACAGGAAGTTT**
cathroseus **GTTAACTTGCATGCCATGGCTGCA---GATAACAAGTTGAAAGTGATCTTACAGAAAATAT**
chenoprubr **GTGAGCTTTTCATATGGCGGCACCA---GAAGGCAGGCTGAGAGCAGTTTACAAGAAATTT**
glymax **GCCAACCTTCATGCTGCTGCTGCCAGGAAGTAAGCTTAGGGCAGTTTACAAGAAATTC**

1330 1340 1350 1360 1370 1380

chicintyb **GTGAATCCAGAAAAGGTGCGGTGGCACTTTTCCCTCCGGCGAGAAGTCTGTGGTGGAG**
nictab **TCCAGTCCAGATAGAGGTGCTGTTGCATTCTTCCCACCAGCAAGAAATCTTCTACTACT**
pethybr **TCTAGTCCAGATAGAGGTGCTGTTGCCCTCTTCCCACCAGCAAGAAATCTTCTACTACT**
cathroseus **TCCAGCTTGGAGAGGGCTCTGTTGCTTACCACCTGCCAAATCTTATTTGGCCTAA**
chenoprubr **TCCGAAACCAGACAATGGCGCTTCCCTTCCGACCTCCAGCCAAAGCTTTTGGTTCG**
glymax **TCTAACTCGGATCTTCTGCTGTTGCTCTTCTTCTCCAGCAAGGACTTGTACACTG**

1390 1400 1410

chicintyb **ATTGGCGGTGGGAATCTTCATAA-----**
nictab **ACTACTACTGATGCTGCTTCTCCTCTTCTTGA**
pethybr **ACTACTACTACTACTACTCTTCTTGA-----**

cathroseus -----
chenoprubr ACTTCATGA-----
glymax TCTTGA-----



*Discussion Générale
et
Perspectives*

Discussion Générale et Perspectives

Le but de nos recherches, dont les résultats ont été présentés dans ce mémoire, concerne la compréhension des mécanismes du développement racinaire de la chicorée. Contrairement au modèle *A. thaliana*, la croissance primaire de la racine de chicorée, aboutissant à la formation d'un système racinaire composé d'une racine principale et de racines latérales, est suivi d'un processus de tubérisation. Elle consiste en des réorientations métaboliques, accompagnées d'une importante croissance en épaisseur. Les différentes phases du développement racinaire impliquent un équilibre entre les divisions cellulaires et la différenciation. Deux constructions, pCycB1;1-*uidA* et pCycA2;1-*uidA*, dans lesquelles le gène rapporteur *uidA* codant la β -glucuronidase d'*E. coli* est respectivement sous le contrôle des promoteurs des cyclines B1;1 et A2;1 d'*A. thaliana*, ont été mises à notre disposition. L'étude de l'activité de ces deux promoteurs au cours du développement racinaire de la chicorée, a été réalisée par le biais de tests histochimiques GUS. En complément à ces tests, un gène codant une cycline mitotique de type B1 a été isolé et caractérisé.

En 1994, Ferreira et collaborateurs ont étudié l'expression spatiale et temporelle du gène codant la cycline B1;1 chez d'*A. thaliana*. Dans les méristèmes racinaires et caulinaires et durant l'embryogenèse, l'expression de *cycB1;1* est exclusivement confinée dans les cellules en division et dans les cellules qui sont réactivées pour ré-entrer dans le cycle cellulaire. Ils ont également montré que cette cycline s'exprimait au niveau des cellules du péri-cycle qui sont à l'origine des racines latérales ainsi que dans les cellules des primordiums de ces futures racines latérales. Son expression constitue à ce titre un événement précoce détecté bien avant l'observation des divisions cellulaires. Ces travaux ont permis de faire de la cycline B1;1 un marqueur du cycle cellulaire spécifique des cellules en division.

Les caractéristiques de l'expression spatio-temporelle de la cycline B1;1 d'*A. thaliana* ont amené à l'utilisation de ce gène comme marqueur dans l'étude du développement ou de la dédifférenciation cellulaire chez plusieurs espèces végétales (Nebel *et al.*, 1996; Setiady *et al.*, 1997; Rhode *et al.*, 1997; Mews *et al.*, 2000; Jelenska *et al.*, 2000; Boucheron *et al.*, 2002). Par exemple, dans le but d'étudier les facteurs qui régulent l'expression de gènes contrôlant le cycle cellulaire dans des bourgeons de peupliers, Rohde *et al.* (1997) ont transformé des peupliers avec la construction pCycB1;1-*uidA*. L'activité du promoteur a été décelée au niveau des méristèmes caulinaires et au sein de primordiums de jeunes feuilles. Ils

ont ainsi montré que, tout comme chez *A. thaliana*, ce promoteur est actif dans les zones méristématiques. Cependant récemment, Boucheron *et al.* (2002) ont mis en évidence une activité de la β -glucuronidase dans des plantes de tabacs contenant le gène *uidA*, sous le contrôle de ce même promoteur, au niveau de cellules du phloème interne qui ne subissent pas de divisions, mais qui pourraient avoir acquis la compétence à se diviser. Ils proposent donc que l'activité du promoteur de la cycline B1;1 d'*A. thaliana* pourrait, en plus d'être un bon marqueur de la division cellulaire, devenir un marqueur de la réactivation de cellules qui possèdent une compétence forte pour la dédifférenciation. L'expression de *cycB1;1* ne serait pas liée exclusivement à la division cellulaire.

Burssens *et al.* (2000) ont étudié, chez *A. thaliana*, l'expression du gène rapporteur *uidA* sous le contrôle du promoteur de la cycline A2;1. Ils ont montré que, contrairement à la cycline B1;1, l'activité du promoteur de la cycline A2;1 n'est pas simplement limitée aux cellules en division, mais aussi aux cellules qui ne se divisent pas, tout en gardant cependant la compétence à se diviser. Cette cycline ne serait donc pas un facteur limitant de la division cellulaire. Par exemple, lors de la formation des racines latérales, son expression n'est pas limitée aux cellules du péri-cycle situées face aux pôles de xylème, mais aussi au niveau des cellules du parenchyme médullaire. Lors des mécanismes plus tardifs de la formation des racines latérales, ces cellules joueraient un rôle dans les connexions vasculaires entre la racine principale et les racines latérales (Burssens *et al.*, 2000).

Lors de l'étude du développement de la racine de chicorée, l'activité du promoteur de la cycline B1;1 d'*A. thaliana* a été mise en évidence, non seulement dans les cellules en division, mais aussi au niveau de cellules dans lesquelles nous n'avons pas constaté de division. En effet, lors de la formation des racines latérales, l'activité du promoteur pCycB1;1 est présente dans des cellules corticales qui ne se divisent pas. De manière plus surprenante, cette activité est polarisée, puisqu'elle n'est présente que dans les cellules corticales situées face aux primordiums de racines latérales. Lors de la croissance en épaisseur de la racine, l'activité de pCycB1;1 est observée dans les cellules du cortex, de l'endoderme et du péri-cycle, dans lesquels les divisions ne sont pas systématiques. Par contre, aucune activité n'a été décelée au niveau du rhizoderme. Ces cellules sont vivantes, mais elles ne se divisent plus. Elles sont remplacées progressivement, au cours du développement racinaires, par les cellules corticales adjacentes.

Chez la chicorée, que ce soit dans l'apex racinaire de graines en germination, de plantes âgées, ou lors de la formation des racines latérales, l'activité du promoteur de la cycline A2;1 d'*A. thaliana* a été observée au niveau de tous les types cellulaires. Elle

s'observe, en effet, dans les cellules en division ou dans les cellules qui ne se divisent pas, à l'exception des cellules de la coiffe et des cellules constituant ce qui pourrait être le centre quiescent. En accord avec ce qui a été démontré chez *A. thaliana*, nous pouvons supposer qu'au cours du développement racinaire de la chicorée, toutes les cellules, dans lesquelles une activité du promoteur pCycA2;1 a été observée, gardent une compétence à se diviser. Cette compétence rendrait possible la division de ces cellules afin d'accompagner la croissance en épaisseur de la racine initiée au niveau du cambium vasculaire.

En définitive, l'activité de ces promoteurs lors du développement racinaire est assez proche de celle trouvée chez *A. thaliana*. Nous pouvons noter cependant des différences, dont la plus surprenante concerne l'activité du promoteur pCycB1;1 dans des cellules différenciées qui ne se divisent pas. Afin de comprendre l'origine de cette différence d'expression, nous avons émis alors trois hypothèses :

- Le promoteur pCycB1;1 d'*A. thaliana* serait-il, dans la chicorée, activé au niveau de sites de blessure et de nécrose? En effet, lors de la formation des racines latérales, les cellules corticales situées face aux primordiums sont vouées à être éliminées. Ces cellules pourraient donc répondre à ce stress par l'activation de gènes contrôlant la division cellulaire. Les divisions permettraient alors de rétablir la cohésion entre les tissus de la racine principale et de la racine latérale. Chez *A. thaliana*, l'expression de *cycB1;1* est stimulée par des blessures pratiquées au niveau de feuilles (Colon-Carmona *et al.*, 1999). L'expression de ce gène pourrait être dans ce cas liée à la réactivation de cellules entrant dans un processus de réparation des lésions. Lors de l'étude de la germination, nous avons involontairement blessé des cotylédons et des radicules. Nous avons pu observer une activité de la β -glucuronidase autour des sites de blessures. Cependant, nous n'avons jamais pu observer d'événements similaires au niveau des racines matures. En effet, nous avons réalisé des expériences dans lesquelles les racines de chicorée avaient été excisées, lacérées, placées une nuit dans un milieu H₂O liquide, puis soumises aux tests histochimiques GUS. Aucune activité de la β -glucuronidase liée avec certitude à la blessure n'a pu être mise en évidence dans ces conditions. Si le promoteur pCycB1;1 semble être activé en réponse à une blessure, il est possible que cette réponse soit spécifique de certains organes tels que les feuilles, les cotylédons ou les jeunes radicules. Cependant, ces expériences ont été réalisées sur des racines excisées. Nous ne pouvons donc pas écarter l'hypothèse que l'activation du promoteur *cycB1;1* soit, sous l'effet d'une blessure, régulée par des

substances, telles que l'éthylène ou l'acide jasmonique. En effet, l'analyse de la séquence du promoteur pCycB1;1 d'*A. thaliana*, montre la présence de 8 motifs de réponse à l'éthylène ERE (Ethylen-responsive element) **ATTT** (Richard *et al.*, 2002). Des expériences de lésions des cellules corticales pourront donc être envisagées, sur des racines excisées en présence d'hormones de stress ainsi que sur des plantes entières.

- Le promoteur pCycB1;1 serait-il activé dans des cellules différenciées en réponse à une pression mécanique ? Lors de la formation des racines latérales ou lors de la mise en place des tissus secondaires, les cellules corticales subissent des pressions centrifuges venant respectivement du dôme que constitue le primordium de la racine latérale et des tissus secondaires (xylème et phloème secondaires) formés. Des racines de chicorée de différentes tailles ont été placées sur un milieu de culture H₂O gélosé très dense afin d'éviter l'enfoncement des racines dans le milieu. Des poids de différentes masses (1, 5, 10 grammes) ont alors été appliqués sur ces racines pendant 24 et 48 heures. Des tests histochimiques GUS ont été effectués, mais aucune activité de la β -glucuronidase n'a été mise en évidence à l'endroit de l'application des poids. La pression mécanique subie par les cellules corticales différenciées ne semble donc pas expliquer l'activité de ce promoteur dans ces cellules.
- Le promoteur pCycB1;1 serait-il activé en réponse à un signal provenant des primordiums de racines latérales ? De nombreux travaux ont montré l'importance des auxines tout au long du mécanisme de formation des racines latérales. Casimiro *et al.* (2001) ont montré que le transport basipète de l'auxine est essentiel à l'initiation des racines latérales. Reed *et al.* (1998) ont, quant à eux, montré que l'inhibition du transport acropète des auxines entraînait une diminution significative du nombre d'émergences de racines latérales. Les transports basipètes et acropètes des auxines agiraient donc indépendamment et respectivement au niveau de l'initiation des racines latérales et au niveau de l'émergence. Les auxines sont en fait essentielles à différents moments du développement des racines latérales. De plus, lors des phases plus tardives du développement, les primordiums deviennent indépendants d'un apport d'auxines exogènes, montrant ainsi l'existence, au sein même du primordium, de cellules jouant le rôle de sources d'auxines (Casimiro *et al.*, 2003). L'étude de la séquence du promoteur de la cycline B1;1 d'*A. thaliana* a montré l'existence d'un motif AuxRE (Auxin -

responsive element) CTCA de régulation par les auxines, situés entre les résidus 93 et 96 de la région promotrice (Richard *et al.*, 2002). Nous pouvons envisager d'introduire, dans des chicorées, le gène rapporteur *uidA* sous le contrôle du promoteur pCycB1;1 délété de son motif de réponse aux auxines. Des études, concernant l'activité et l'effet de la délétion sur le développement des racines latérales, pourront alors être réalisées. Dans le cas où l'introduction de cette construction n'entraîne aucune modification morphologique, nous pourrions vérifier si l'activité de la β -glucuronidase dans les cellules corticales, situées face aux primordiums de racines latérales, n'est plus détectée. Nous pourrions alors conclure que l'activité du promoteur pCycB1;1 est due, dans ces cellules, à un signal auxinique. Dans le cas où une activité de la β -glucuronidase est tout de même observée dans les cellules corticales, il est important de savoir que le promoteur de la cycline B1;1 d'*A. thaliana*, en plus de posséder un motif de réponse aux auxines, possède un motif de réponse aux gibbérellines et 8 motifs de réponse à l'éthylène. Nous pourrions donc envisager des expériences de délétion de ces différents motifs afin de mettre en évidence la nature du signal potentiel qui permet l'activation du promoteur pCycB1;1 dans des cellules différenciées qui ne se divisent pas.

Au cours du cycle cellulaire, les complexes enzymatiques CDK/cycline contrôlant la progression des cellules à travers le cycle, sont eux-mêmes soumis à des régulations. Ces régulations se font par l'intermédiaire d'événements de phosphorylation/déphosphorylation, ou la liaison à d'autres protéines telles que les KRPs ou les CKS. Dans l'optique d'étudier le contrôle du cycle cellulaire au cours du développement racinaire de la chicorée, il est envisageable de transformer des chicorées à l'aide de constructions dans lesquelles le gène *uidA* serait sous le contrôle de promoteurs de gènes codant des CDKs, des KRPs ou des CKS d'*A. thaliana*.

Parallèlement à l'étude de l'activité de promoteurs de gènes contrôlant le cycle cellulaire au cours du développement de la racine, nous avons isolé et partiellement caractérisé un ADNc correspondant à la partie codante d'un gène de cycline de type B1. Cet ADNc de 1239 pb code une protéine de 412 acides aminés qui possède tous les motifs caractéristiques des cyclines de type B1 : boîte de destruction, boîtes A et B et boîte cycline comprenant le motif HRKF. La technique de RT-PCR semi-quantitative en temps réel

réalisées sur des ADNc issus de suspensions cellulaires traitées par des inhibiteurs du cycle cellulaire ont permis de corréler l'expression de ce gène avec la transition G2/M du cycle cellulaire. Lors de ces expériences, nous avons pu observer que la quantité de transcrits de la cycline de type B1 de chicorée est très faible dans les cellules bloquées par l'hydroxyurée. Ce taux d'ARNm semble montrer qu'une majorité de cellules de chicorées ont été bloquées au niveau de la transition G1/S. Les cellules qui parcourent le cycle cellulaire passent des états à 2c (entre les phases M et S) à des états à 4c (entre les phases S et M). Dans des suspensions cellulaires non traitées par des inhibiteurs, un mélange de cellules à 2c et de cellules à 4c, est présent. Le blocage des cellules de chicorée avant la duplication de l'ADN doit entraîner une augmentation des cellules à 2c et une baisse du nombre de cellules à 4c. Ce déséquilibre entre les deux types cellulaires pourrait être confirmé par des expériences conjuguées de cytométrie de flux et de coloration des noyaux au DAPI (le volume du noyau pouvant traduire la quantité d'ADN présent). Ces résultats complémentaires pourraient montrer que les suspensions cellulaires de chicorée répondent convenablement à la synchronisation en transition G1/S sous l'effet de l'hydroxyurée. Le blocage des cellules par l'hydroxyurée est un événement non létal et réversible. L'obtention d'un pourcentage élevé de cellules synchronisées, bloquées dans une phase du cycle cellulaire, pourrait donc permettre d'utiliser ce matériel afin d'étudier l'expression de gènes contrôlant le cycle cellulaire au cours des différentes phases du cycle cellulaire.

Par ailleurs, des études d'expression, réalisées au cours de la cinétique de croissance des cellules, ont montré que le gène *Ci;CycB1;1* semble s'exprimer exclusivement dans les phases de division active des cellules. Cependant, ces résultats doivent être considérés comme étant préliminaires, car ils n'ont été obtenus qu'à partir d'une seule synthèse d'ADNc. Afin de les confirmer, nous devons répéter ces expériences sur des ADNc issus d'ARN totaux provenant de suspensions cellulaires indépendantes.

En complément de la vérification de ces premiers résultats, il serait intéressant de localiser l'expression de ce gène au cours du développement de la racine de chicorée. Ce gène fait partie d'une famille dans laquelle les séquences sont très conservées. Cependant, il existe du côté 5' de l'ADNc une région spécifique à la cycline B1;1 de chicorée. La séquence de cette région pourrait être utilisée comme sonde dans des expériences d'hybridation *in situ* sur des coupes semi-fines réalisées à différents moments du développement de la racine. Ces expériences permettront de confirmer les résultats obtenus avec les tests histochimiques GUS. Nous avons déjà utilisé la technique d'hybridation *in situ* pour localiser les ARNm du gène *uidA* dans des racines de plantes transformées par la construction pCycB1;1-*uidA*. Cependant,

nous nous sommes heurtés à de nombreuses difficultés techniques concernant l'inclusion du matériel végétal en paraffine ainsi que les différentes étapes de la technique d'hybridation en elle-même. Parallèlement à ces différents problèmes, nous avons utilisé des sondes « froides » marquées à la digoxygénine. Les essais que nous avons réalisés n'ont donné aucun résultat probant et interprétable, à cause des dommages subis par les cellules corticales lors de l'inclusion. Chez *A. thaliana* et chez *Raphanus sativus*, des expériences d'hybridation *in situ* ont été réalisées en utilisant des sondes radiomarquées à l'aide d'UTP -³⁵S (Burssens *et al.*, 2000). L'utilisation de sondes radioactives permettrait d'augmenter la sensibilité de la technique (de Almeida, communication personnelle). Nous pourrions alors utiliser le N-butyle méthyle méthacrylate comme résine d'inclusion. En effet, l'augmentation de la sensibilité de la technique d'hybridation pourrait ainsi pallier les traitements concernant l'élimination de la résine, contraignants pour les ARNm, qui accompagnent l'utilisation de cette résine. Nous envisageons donc d'utiliser le N-butyle méthyle méthacrylate comme résine d'inclusion ainsi que des sondes marquées radioactivement afin de réaliser de nouvelles expériences d'hybridation *in situ* au cours du développement de la racine de chicorée.

Cichorium intybus, appelée « chicorée de Bruxelles » a la particularité de développer une racine pivot tubérisée, résultat d'une croissance en épaisseur importante couplée à une réorientation métabolique qui aboutit au stockage de dérivés glucidiques. Suivant les variétés, cette plante est très utilisée dans la région à la fois en agriculture (var. *foliosum* pour la production d'endive) et en agro-alimentaire (var. *sativum* pour la torréfaction de la racine). Elle représente un intérêt agronomique non négligeable pour le nord de l'Europe où elle est cultivée. Des travaux réalisés précédemment au laboratoire ont concerné la réorientation métabolique au cours de la tubérisation (Druart *et al.*, 2000 ; 2001). Chez la chicorée, l'activité de la nitrate réductase racinaire, devient au cours de la tubérisation principalement foliaire (Dorchies et Rambour, 1985). Dans le même temps, les activités de la saccharose:saccharose fructosyltransférase (1-SST) et de la fructosane:fructosane fructosyltransférase (1-FFT) augmentent dans la racine de manière significative lors de la mise en place des tissus secondaires. Ces augmentations d'activités entraînent une synthèse accrue de l'inuline, qui serait stockée dans les cellules parenchymateuses du phloème secondaire (Van den Ende *et al.*, 2000). Une question d'intérêt agronomique peut alors être posée. La synthèse d'inuline agit-elle comme un signal sur la division du cambium vasculaire afin de produire les tissus secondaires ? La formation de tissus secondaires de réserve entraîne-t-elle la réorientation métabolique aboutissant à la synthèse d'inuline ?

La quantité d'une protéine peut être augmentée par la surexpression de son gène. Cette surexpression peut être obtenue par transformation à l'aide d'une construction dans laquelle le gène serait sous le contrôle d'un promoteur fort tel que le promoteur 35S du CaMV. La transformation de chicorées à l'aide des constructions p35S-cycB1;1 ou p35S-sst pourrait permettre d'observer s'il existe une relation entre l'augmentation de l'activité de l'une des deux protéine au cours de la croissance en épaisseur de la racine et l'activité de l'autre protéine. D'un autre côté, la production d'une protéine peut être inhibée de manière post-transcriptionnelle par la technique d'ARN interférant. Cette technique consiste à transformer un matériel d'étude à l'aide d'une construction dans laquelle une partie du gène cible se trouve en répétition inversée, le tout étant sous le contrôle d'un promoteur fort. L'activité du promoteur entraîne la synthèse d'un ARN double brin qui va être clivé pour former des ARN de petite taille (SiRNA : Small Interfering RNA). Ces petits ARN vont se fixer sur un complexe RISC (RNA Interfering Silencing Complex) et vont cliver l'ARNm cible. Cette technique donne d'excellents résultats, même avec des fragments d'ADN très petits (25 à 50 nucléotides), ce qui permet en l'occurrence de travailler sur des régions spécifiques des gènes cibles afin que l'inhibition soit ciblée (Gotham, 2003). Des chicorées pourraient être transformées par des fragments répétés inversés de *cycB1;1* ou de la *1-SST*. Après avoir vérifié l'implication de telles constructions sur le développement de la racine, ces plantes pourraient servir de matériel d'étude afin d'observer l'implication de la baisse de l'activité de la cycline B1;1 sur la synthèse d'inuline et de la baisse de l'activité de la 1-SST sur les divisions cellulaires au niveau du cambium vasculaire. A terme, nous pourrions envisager une stratégie, par la modification de l'expression de ces deux gènes, afin de produire des plants de chicorée qui présentent une augmentation significative du diamètre de la racine et/ou de la quantité d'inuline stockée.

Cependant, l'analyse du génome complet d'*A. thaliana* a montré la présence chez cette plante de 30 gènes de cyclines regroupés en 14 classes (Vandepoele *et al.*, 2002). Quatre gènes de cyclines de type B1 ont été isolés chez le lupin (Jelenska *et al.*, 2000). Le grand nombre de gènes codant des cyclines chez les plantes montre d'une part que ces cyclines sont certainement spécifiques non seulement d'une phase du cycle cellulaire, mais aussi probablement d'un tissu ou d'un moment précis du développement de la plante. De plus, le contrôle du cycle cellulaire est réalisé par des complexes CDK/cycline, eux-mêmes soumis à des régulations importantes par l'intermédiaire de phosphorylation/déphosphorylation et par l'association à des protéines inhibitrices (KRP) ou activatrices (CKS). En fait, l'annotation du génome d'*A. thaliana* a mis en évidence 61 gènes codant des protéines qui interviennent dans

la régulation du cycle cellulaire. A l'heure actuelle, nous avons obtenu, chez la chicorée, la séquence codante complète de la cycline B1;1 de chicorée (Ci;CycB1;1). Nous possédons aussi des séquences homologues à des CDKs et à une KRP (Legrand, 2002; Guilbert, 2003). Dans la stratégie d'analyse des mécanismes aboutissant à la tubérisation de la racine, il serait très intéressant de poursuivre ce programme d'isolement et de caractérisation de gènes contrôlant le cycle cellulaire chez la chicorée. Parmi ces gènes, notre intérêt principal se portera sur l'isolement d'un gène codant une cycline de type A. En effet les tests histochimiques réalisés sur des chicorées transformées à l'aide de la construction *pcycA2 ;1-uidA* ont montré que ce promoteur était activé dans la majeure partie des cellules tout au long du développement racinaire, suggérant que ces cellules ont gardé une compétence à se diviser. Comme nous l'avons dit précédemment, les divisions importantes des cellules du cambium vasculaire entraînent une forte croissance en épaisseur qui aboutit à la formation d'une racine pivot tubérisée. Même si les tissus situés à l'extérieur du péricycle sont voués à disparaître dans une racine de chicorée mature, des divisions au sein de ces tissus ont été observées. Ces divisions sont essentielles à l'augmentation du diamètre de la racine. La capacité qu'ont les cellules corticales ou de l'endoderme à se réactiver lors de la tubérisation pourrait alors expliquer qu'elles aient gardé une compétence à se diviser lors des phases plus précoces du développement racinaire. L'expression de *cycA2 ;1* étant, chez *A. thaliana*, liée à la compétence à se diviser, la transformation de chicorées à l'aide de fragments répétés inversés de la cycline A2;1, pourrait nous permettre de savoir si cette dernière est essentielle au maintien de la compétence à se diviser des cellules différenciées de la racine.

Enfin une étude moléculaire de la tubérisation a été initiée au laboratoire (Goupil *et al.*, 2003). Il serait intéressant de poursuivre l'isolement et la caractérisation de marqueurs moléculaires de la tubérisation, dont l'expression différentielle est encore mal connue à ce jour. L'analyse par comparaison des profils de cDNA-AFLP réalisés sur des parties de la racine produisant ou non des tissus secondaires pourrait nous permettre de mettre en évidence des gènes cibles, dont l'expression serait modifiée lors de la croissance en épaisseur. Ces gènes pourront alors être isolés et caractérisés afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires de la tubérisation qui restent encore très mal connus.



Références Bibliographiques

Références Bibliographiques

Cette bibliographie fait référence aux articles cités dans les parties du manuscrit écrites en français.

Aloni R. (1995). The induction of vascular tissues by auxin and cytokinins. In: Davies PJ, editor. *Plant Hormones*. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 531-546.

Améziane R., Limami A., Noctor G., Morot-Gaudry J.F. (1995). Effect of nitrate concentration during growth on carbon partitioning and sink strength in chicory. *J. Exp. Bot.* **46**, 1423-1428.

Baima S., Possenti M., Matteucci A., Wisman E., Altamura M.M., Ruberti I., Morelli G. (2001). The arabidopsis ATHB-8 HD-zip protein acts as a differentiation-promoting transcription factor of the vascular meristems. *Plant Physiol.* **126**, 643-655.

Barrôco R.M., De Veylder L., Magyar Z., Engler G., Inzé D., Mironov V. (2003). Novel complexes of cyclin-dependent kinases and a cyclin-like protein from *Arabidopsis thaliana* with a function unrelated to cell division. *CMLS* **60**, 401-412.

Beeckman T., Burssens S., Inzé D. (2001). The peri-cell-cycle in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* **52**, 403-411.

Berleth T., Jurgens G. (1993). The role of MONOPTEROS gene in organising the basal body region of the *Arabidopsis* embryo. *Development* **118**, 575-587.

Bhalerao R., Eklöf J., Ljung K., Marchant A., Bennett M., Sandberg G. (2002). Shoot-derived auxin is essential for early lateral root emergence in *Arabidopsis* seedlings. *Plant J.: For Cell And Molecular Biology* **29**, 325-332.

Blilou I., Frugier F., Folmer S., Serralbo O., Willemsen V., Wolkenfelt H., Eloy N.B., Ferreira P.C.G., Weisbeek P., Scheres B. (2002). The *Arabidopsis* *HOBBIT* gene encodes a CDC27 homolog that links the plant cell cycle to progression of cell differentiation. *Genes and Development* **16**, 2566-2575.

Boucheron E., Guivarc'h A., Azmi A., Dewitte W., Van Onckelen H., Chriqui D. (2002). Competency of *Nicotiana tabacum* L. stem tissues to dedifferentiate is associated with differential levels of cell cycle gene expression and endogenous cytokinins *Planta* **215**, 267-278.

- BursSENS S., de Almeida Engler J., Beeckman T., Richard C., Shaul O., Ferreira P., Van Montagu M., Inzé D.** (2000). Developmental expression of the *Arabidopsis thaliana* CycA2;1 gene *Planta* **211**, 623-631.
- Bustin S.A.** (2002). Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J. Mol. Endocrinol.* **29**, 23-39.
- Casero P.J., Casimiro L., Lloret P.G.** (1995). Lateral root initiation by asymmetrical transverse divisions of the pericycle cells in four plant species: *Raphanus sativum*, *Helianthus annuus*, *Zea mays*, and *Daucus carota*. *Protoplasma* **188**, 49-58.
- Casimiro I., Beeckman T., Graham N., Bhalerao R., Zhang H., Casero P., Sandberg G., Bennett M.J.** (2003). Dissecting *Arabidopsis* lateral root development. *Trends In Plant Science* **8**, 165-171.
- Casimiro I., Marchant A., Beeckman T., Dhooge S., Swarup R., Graham N., Inzé D., Sandberg G., Casero P.J., Bennett M.** (2001). Auxin transport promotes *Arabidopsis* lateral root initiation. *Plant Cell* **13**, 843-852.
- Chaffey N.J., Barnett J., Barlow P.** (1997). Endomembranes, Cytoskeleton and cell walls: aspects of the ultrastructure of the vacular cambium of taproots of *Aesculus hippocastanum* L. (Hippocastanacées). *Int. J. Plant Sci.* **158**, 97-109.
- Cockcroft C.E., den Boer B.G., Healy J.M., Murray J.A.** (2000). Cyclin D control of growth rate in plants. *Nature* **405**, 575-579.
- Colon-Carmona A., You R., Haimovitch-Gal T., Doerner P.** (1999). Spatio-temporal analysis of mitotic activity with a labile cyclin-GUS fusion protein. *Plant J.* **20**, 503-508.
- Cui K., Wu S., Wei L., Little C.H.A.** (1996). Effect of exogenous IAA on the regeneration of vascular tissues and periderm in girdled *Betula pubescens* stems. *Chinese J. Bot.* **7**, 17-23.
- De Mirbel M.** (1828). Mémoire sur l'origine, le développement et l'organisation du liber et du bois. *Mém. Muséum Hist. Nat.* **16**, 9-36.
- De Smet I., Signora L., Beeckman T., Inzé D., Foyer C., Zhang H.** (2003). An abscisic acid-sensitive checkpoint in lateral root development of *Arabidopsis*. *Plant J.: For Cell And Molecular Biology* **33**, 543-555.
- De Veylder L., Beeckman T., Beemster G.T., Krols L., Terras F., Landrieu I., van der Schueren E., Maes S., Naudts M., Inzé D.** (2001). Functional analysis of cyclin-dependent kinase inhibitors of *Arabidopsis*. *Plant Cell* **13**, 1653-1668.
- De Veylder L., de Almeida Engler J., BursSENS S., Manevski A., Lescure B., Van Montagu M., Engler G., Inzé D.** (1999). A new D-type cyclin of *Arabidopsis thaliana* expressed during lateral root primordia formation. *Planta* **208**, 453-462.

- Dewitte W., Riou-Khamlichi C., Scofield S., Healy J.M.S., Jacquard A., Kilby N.J., Murray J.A.H.** (2003). Altered cell cycle distribution, hyperplasia, and inhibited differentiation in *Arabidopsis* caused by the D-type cyclin CYCD3. *Plant Cell* **15**, 79-92.
- Di Laurenzio L., Wysocka-Diller J., Malamy J.E., Pysh L., Helariutta Y., Freshour G., Hahn M.G., Feldmann K.A., Benfey P.N.** (1996). The *SCARECROW* gene regulates an asymmetric cell division that is essential for generating the radial organization of the *Arabidopsis* root. *Cell* **86**, 223-233.
- Doerner P., Jørgensen J.E., You R., Steppuhn J., Lamb C.** (1996). Control of root growth and development by cyclin expression. *Nature* **380**, 520-523.
- Dorchies V., Rambour S.** (1985). Activité nitrate réductase chez *Cichorium intybus* (var. Witloof) à différents stades de développement et dans les tissus cultivés *in vitro*. *Physiol. Vég.* **23**, 25-35.
- Druart N., De Roover J., Van den Ende W., Goupil P., Van Laere A., Rambour S.** (2001). Sucrose assimilation during early developmental stages of chicory (*Cichorium intybus* L.) plants. *Planta* **212**, 436-443.
- Druart N., Goupil P., Dewaele E., Boutin J.P., Rambour S.** (2000). Nitrate assimilation in chicory roots (*Cichorium intybus* L.) which acquire radial growth, *J. Exp. Bot.* **51**, 539-546.
- Dubois T., Droujininski A., Vasseur J.** (1988). Croissance et potentialités organogènes de suspensions cellulaires de *Cichorium intybus* L. var Witloff. *Bulletin de la Société Botanique de France* **135**, 311-322.
- Dubrovsky J.G., Rost T.L., Colón-Carmona A., Doerner P.** (2001). Early primordium morphogenesis during lateral root initiation in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **214**, 30-36.
- Eklund L., Little C.H.A.** (1996). Laterally applied Ethrel causes local increases in radial growth and indol-3-acetic acid concentration in *Abies balsamea* shoots. *Tree Physiol.* **16**, 509-513.
- Ferreira P.C., Hemerly A.S., Engler J.D., van Montagu M., Engler G., Inzé D.** (1994). Developmental expression of the arabidopsis cyclin gene *cyc1At* *Plant Cell* **6**, 1763-1774.
- Fouldrin K., Limami A.** (1993). The influence of (15NO₃) supply to chicory (*Cichorium intybus* L.) plants during forcing on the uptake and remobilization of N reserves for chicon growth. *J. of Exp. Bot.* **44**, 1313-1319.
- Glotzer M., Murray A.W., Kirschner M.W.** (1991). Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* **349**, 132-138.
- Gotham S.** (2003). Antisense and siRNA technologies - SMi Conference. 12-13 February 2003, London, UK. *IDrugs* **6**, 211-214.

- Goupil P., Mahamoud Y.S., Poulain J., Windels D., Crete P., Huss B., Rambour S.** (2003). cDNA-AFLP display for the isolation of differentially expressed genes during chicory root development. *J. Plant Physiol.* **160**, 303-309.
- Grew N.** (1682). *The Anatomy of Plants*. Rawlins, London.
- Hardtke C.S., Berleth T.** (1998). The *Arabidopsis* gene MONOPTEROS encodes a transcription factor mediating embryo axis formation and vascular development. *EMBO J.* **17**, 1405-1411.
- Hartig T.** (1853). Ueber die Entwicklung des Jahrringes der Holzpflanzen. *Bot. Zeit.* **11**, 533-566, 569-579.
- Healy J.M., Menges M., Doonan J.H., Murray J.A.** (2001). The *Arabidopsis* D-type cyclins CycD2 and CycD3 both interact in vivo with the PSTAIRE cyclin-dependent kinase Cdc2a but are differentially controlled. *J. Biol. Chem.* **276**, 7041-7047.
- Hemerly A., Bergounioux C., Van Montagu M., Inzé D., Ferreira P.** (1992). Genes regulating the plant cell cycle: isolation of a mitotic-like cyclin from *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 3295-3299.
- Hemerly A.S., Ferreira P.C., Van Montagu M., Engler G., Inzé D.** (2000). Cell division events are essential for embryo patterning and morphogenesis: studies on dominant-negative cdc2aAt mutants of *Arabidopsis*. *Plant J.: For Cell And Molecular Biology* **23**, 123-130.
- Hertzberg M., Olsson O.** (1998). Molecular characterisation of a novel plant homeobox gene expressed in the maturing xylem zone of *Populus tremula x tremuloides*, *Plant J.: For Cell And Molecular Biology* **16**, 285-295.
- Himanen K., Boucheron E., Vanneste S., de Almeida Engler J., Inzé D., Beeckman T.** (2002). Auxin-mediated cell cycle activation during early lateral root initiation. *Plant Cell* **14**, 2339-2351.
- Howard A., Pelc S.R.** (1953). Synthesis of deoxyribonucleic acid in normal and irradiated cells and its regulation to chromosome breakage. *Heredity (suppl.)* **6**, 216-273.
- Hu Y., Bao F., Li J.** (2000). Promotive effect of brassinosteroids on cell division involves a distinct CycD3-induction pathway in *Arabidopsis*. *Plant J.: For Cell And Molecular Biology* **24**, 693-701.
- Huntley R., Healy S., Freeman D., Lavender P., de Jager S., Greenwood J., Makker J., Walker E., Jackman M., Xie Q., Bannister A.J., Kouzarides T., Gutiérrez C., Doonan J.H., Murray J.A.** (1998). The maize retinoblastoma protein homologue ZmRb-1 is regulated during leaf development and displays conserved interactions with G1/S regulators and plant cyclin D (CycD) proteins. *Plant Mol. Biol.* **37**, 155-169.

- Jelenska J., Deckert J., Kondorosi E., Legocki A.B.** (2000). Mitotic B-type cyclins differentially regulated by phytohormones and during yellow lupine nodule development. *Plant Science* **150**, 29-39.
- Joubès J., Chevalier C., Dudits D., Heberle-Bors E., Inzé D., Umeda M., Renaudin J.P.** (2000). CDK-related protein kinases in plants. *Plant Mol. Biol.* **43**, 607-620.
- Korolev A.V., Tomos A.D., Bowtell R., Farrar J.F.** (2000). Spatial and temporal distribution of solutes in the developing carrot taproot measured at single-cell resolution, *J. Exp. Bot.* **51**, 567-577.
- Lachaud S., Catesson A.M., Bonnemain J.L.** (1999). Structure and functions of the vascular cambium. *Comptes Rendus De l' Academie Des Science* **322**, 633-650.
- Larson P.R.** (1994). *The Vascular Cambium: Development and Structure*. Springer-Verlag, Berlin.
- Legrand S.** (2002). Isolement de genes contrôlant le cycle cellulaire (ICK, CDK) chez la chicorée. D.E.A. Stratégies d'Exploitation des Fonctions Biologiques. Université des Sciences et Technologies de Lille. Pages 1-47.
- Little C.H.A., Pharris R.P.** (1995). Hormonal control of radial and longitudinal growth in the tree stem. In: Gartner BL, editor. *Plant stems: physiology and functional morphology*. San Diego: Academic Press, 281-319.
- Magyar Z., Mészáros T., Miskolczi P., Deák M., Fehér A., Brown S., Kondorosi E., Athanasiadis A., Pongor S., Bilgin M., Bakó L., Koncz C., Dudits D.** (1997). Cell cycle phase specificity of putative cyclin-dependent kinase variants in synchronized alfalfa cells. *Plant Cell* **9**, 223-235.
- Malamy J.E., Benfey P.N.** (1997). Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development* **124**, 33-44.
- Malamy J.E., Ryan K.S.** (2001). Environmental regulation of lateral root initiation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **127**, 899-909.
- Marchant A., Bhalerao R., Casimiro I., Eklöf J., Casero P.J., Bennett M., Sandberg G.** (2002). AUX1 promotes lateral root formation by facilitating indole-3-acetic acid distribution between sink and source tissues in the *Arabidopsis* seedling. *Plant Cell* **14**, 589-597.
- McKibbin R.S., Halford N.G., Francis D.** (1998). Expression of fission yeast *cdc25* alters the frequency of lateral root formation in transgenic tobacco. *Plant Mol. Biol.* **36**, 601-612.
- Mészáros T., Miskolczi P., Ayaydin F., Pettkó-Szandtner A., Peres A., Magyar Z., Horváth G.V., Bakó L., Fehér A., Dudits D.** (2000). Multiple cyclin-dependent kinase

complexes and phosphatases control G2/M progression in alfalfa cells Plant Mol. Biol. **43**, 595-605.

Mews M., Sek F.J., Volkmann D., John P.C.L. (2000). Immunodetection of four mitotic cyclins and the Cdc2a protein kinase in the maize root : their distribution in cell development and dedifferentiation. Protoplasma **212**, 236-249.

Mironov V., De Veylder L., Van Montagu M., Inzé D. (1999). Cyclin dependent kinases and cell division in higher plants - the nexus. Plant Cell **11**, 509-521.

Moritz T., Sundberg B. (1996). Endogenous cytokinins in the vascular cambial region of *Pinus sylvestris* during activity and dormancy. Physiol. Plant. **98**, 693-698.

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

Nakajima K., Sena G., Nawy T., Benfey P.N. (2001). Intercellular movement of the putative transcription factor SHR in root patterning. Nature **413**, 307-311.

Niebel A., de Almeida Engler J., Hemerly A., Ferreira P., Inzé D., Van Montagu M., Godelieve G. (1996). Induction of *cdc2a* and *cycl1At* expression in *Arabidopsis thaliana* during early phases of nematode-induced feeding cell formation. Plant J. **10**, 1037-1043.

Palms B., Goupil P., Rambour S. (1996). Evidence for the nitrate-dependent spatial regulation of the nitrate reductase gene expression in chicory roots. Planta **200**, 20-27.

Pines J. (1996). Cyclin from sea urchins to HeLas: making the human cell cycle. Bioch. Soc. Trans. **24**, 15-33.

Planchais S., Glab N., Inzé D., Bergounioux C. (2000). Chemical inhibitors : a tool for plant cell cycle studies. FEBS Letters **476**, 78-83.

Przemeck G.K.H., Mattson J., Hardtke C.S., Sung Z.R., Berleth T. (1996). Studies on the role of the *Arabidopsis* gene MONOPTEROS in vascular development and plant cell axialization. Planta **200**, 229-237.

Pysh L.D., Wysocka-Diller J., Camilleri C., Bouchez D., Benfey P.N. (1999). The GRAS gene family in Arabidopsis: sequence characterization and basic expression analysis of the *SCARECROW-LIKE* gene. Plant J. **18**, 111-119.

Raatz W. (1892). Die Stabbildungen im secundären Holzkörper der Bäume und die Initialentheorie. Jahrb. Wiss. Bot. **23**, 567-636.

Reed R.C., Brady S.R., Muday G.K. (1998). Inhibition of auxin movement from the shoot into the root inhibits lateral root development in Arabidopsis. Plant Physiology, **118**, 1369-1378.

- Renaudin J.P., Doonan J.H., Freeman D., Hashimoto J., Hirt H., Inzé D., Jacobs T., Kouchi H., Rouzé P., Sauter M., Savouré A., Sorrell D.A., Sundaresan V., Murray J.A.** (1996). Plant cyclins: a unified nomenclature for plant A-, B- and D-type cyclins based on sequence organization *Plant Mol. Biol.* **32**, 1003-1018.
- Richard C., Lescot M., Inzé D., De Veylder L.** (2002). Effect of auxin, cytokinin, and sucrose on cell cycle gene expression in *Arabidopsis thaliana* cell suspension cultures. *Plant Cell, Tissue, and Organ Culture* **69**, 167-176.
- Riou-Khamlichi C., Huntley R., Jacquard A., Murray J.A.** (1999). Cytokinin activation of *Arabidopsis* cell division through a D-type cyclin. *Science* **283**, 1541-1544.
- Riou-Khamlichi C., Menges M., Healy J.M., Murray J.A.** (2000). Sugar control of the plant cell cycle: differential regulation of *Arabidopsis* D-type cyclin gene expression *Mol. Cell. Biol.* **20**, 4513-4521.
- Rohde A., Van Montagu M., Inzé D., Boerjan W.** (1997). Factors regulating the expression of cell cycle genes in individual buds of *Populus*. *Planta* **201**, 43-52.
- Rose T.M., Henikoff J.G., Henikoff S.** (2003). CODEHOP (CONsensus-DEgenerate Hybrid Oligonucleotide Primer) PCR primer design. *Nucleic Acids Res.* **31**, 3763-3766.
- Roudier F., Fedorova E., Györgyey J., Feher A., Brown S., Kondorosi A., Kondorosi E.** (2000). Cell cycle function of a *Medicago sativa* A2-type cyclin interacting with a PSTAIRE-type cyclin-dependent kinase and a retinoblastoma protein *Plant J.: For Cell And Molecular Biology* **23**, 73-83.
- Russo A.A., Jeffrey P.D., Pavletich N.P.** (1996). Structural basis of cyclin-dependent kinase activation by phosphorylation *Nat. Struct. Biol.* **3**, 696-700.
- Sanio K.** (1873). Anatomie der gemeinen Kiefer (*Pinus Sylvestris* L.). *Jahrb. Wiss. Bot.* **9**, 50-126.
- Scheres B., Di Laurenzio L., Willemsen V., Hauser M.T., Janmaat K., Weisbeek P., Benfey P.N.** (1995). Mutations affecting the radial organization of the *Arabidopsis* root display specific defects throughout the radial axis. *Development* **121**, 53-62.
- Sechley K.A., Oaks A., Bewley J.D.** (1991). Enzymes of nitrogen assimilation undergo seasonal fluctuations in the roots of persistent weedy perennial *Cichorium intybus*. *Plant Physiol.* **97**, 322-329.
- Setiady Y.Y., Sekine M., Yamamoto T., Kouchi H., Shinmyo A.** (1997). Expression pattern of tobacco cyclin genes. *Plant Cell Reports* **16**, 368-372.

Shaul O., Mironov V., Burssens S., Van Montagu M., Inze D. (1996). Two Arabidopsis cyclin promoters mediate distinctive transcriptional oscillation in synchronized tobacco BY-2 cells Proc.Natl. Acad.Sci. U.S.A. **93**, 4868-4872.

Signora L., De Smet I., Foyer C.H., Zhang H. (2001). ABA plays a central role in mediating the regulatory effects of nitrate on root branching in Arabidopsis. Plant J.: For Cell And Molecular Biology **28**, 655-662.

Silver J.D., Keerikatte V. (1989). Novel use of polymerase chain reaction to amplify cellular DNA adjacent to an integrated provirus. J. Virol **63**, 1924-1928.

Sorrell D.A., Marchbank A., McMahon K., Dickinson J.R., Rogers H.J., Francis D. (2002). A WEE1 homologue from *Arabidopsis thaliana*. Planta **215**, 518-522.

Sorrell D.A., Menges M., Healy J.M., Deveaux Y., Amano C., Su Y., Nakagami H., Shinmyo A., Doonan J.H., Sekine M., Murray J.A. (2001). Cell cycle regulation of cyclin-dependent kinases in tobacco cultivar Bright Yellow-2 cells. Plant Physiol. **126**, 1214-1223.

Stals H., Inzé D. (2001). When plant cells decide to divide Trends In Plant Science **6**, 359-364.

Sterky F., Regan S., Karlsson J., Hertzberg M., Rohde A., Holmberg A., Amini B., Bhalerao R., Larsson M., Villaruel R., Van Montagu M., Sandberg G., Olsson O., Teeri T.T., Boerjan W., Gustafsson P., Uhlén M., Sundberg B., Lundeberg J. (1998). Gene discovery in the wood-forming tissues of poplar: analysis of 5, 692 expressed sequence tags. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A **95**, 13330-13335.

Stern B., Nurse P.A. (1996). Quantitative model for the cdc2 control of S phase and mitosis in fission yeast. Trends In Genetics **12**, 345-350.

Sun Y., Dilkes B.P., Zhang C., Dante R.A., Carneiro N.P., Lowe K.S., Jung R., Gordon-Kamm W.J., Larkins B.A. (1999a). Characterization of maize (*Zea mays L.*) Wee1 and its activity in developing endosperm Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **96**, 4180-4185.

Sun Y., Flannigan B.A., Setter TL. (1999b). Regulation of endoreduplication in maize (*Zea mays L.*) endosperm. Isolation of a novel B1-type cyclin and its quantitative analysis. Plant Mol. Biol. **41**, 245-258.

Swarup R., Friml J., Marchant A., Ljung K., Sandberg G., Palme K., Bennett M. (2001). Localization of the auxin permease AUX1 suggests two functionally distinct hormone transport pathways operate in the Arabidopsis root apex. Genes & Development **15**, 2648-2653.

Têtu J.F. (2000). Clonage et caractérisation du promoteur du gène de la nitrate réductase chez *Cichorium intybus L.* Recherche de facteurs de transcription contrôlant l'expression de la

nitrate réductase en fonction de la source azotée. Thèse de Doctorat de l'Université des Sciences et Technologies de Lille1.

Ugglä C., Mellerowicz E.J., Sundberg B. (1998). Indole-3-acetic acid controls cambial growth in scots pine by positional signaling. *Plant Physiol.* **117**, 113-121.

Ulmasov T., Hagen G., Guilfoyle T.J. (1997). ARF1, a transcription factor that binds to auxin response elements. *Science*, **276**, 1865-1868.

Umeda M., Bhalerao R.P., Schell J., Uchimiya H., Koncz C. (1998). A distinct cyclin-dependent kinase-activating kinase of *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad.Sci. U.S.A.* **95**, 5021-5026.

Van den Berg C., Weisbeek P., Scheres B. (1998). Cell fate and cell differentiation status in the *Arabidopsis* root. *Planta* **205**, 483-491.

Van den Berg C., Willemsen V., Hage W., Weisbeek P., Scheres B. (1995). Cell fate in the *Arabidopsis* root meristem determined by directional signaling. *Nature* **378**, 62-65.

Van den Berg C., Willemsen V., Hendriks G., Weisbeek P., Scheres B. (1997). Short-range control of cell differentiation in the *Arabidopsis* root meristem. *Nature* **390**, 287-289.

Van den Ende W., Michiels A., Van Wonterghem D., Vergauwen R., Van Laere A. (2000). Cloning, developmental, and tissue-specific expression of sucrose:sucrose 1-fructosyl transferase from *Taraxacum officinale*. Fructan localization in roots. *Plant Physiol.* **123**, 71-80.

Vandepoele K., Raes J., De Veylder L., Rouzé P., Rombauts S., Inzé D.(2002). Genome-wide analysis of core cell cycle genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **14**, 903-916.

Vernoux T., Wilson R.C., Seeley K.A., Reichheld J.P., Muroy S., Brown S., Maughan S.C., Cobbett C.S., Van Montagu M., Inzé D., May M.J., Sung Z.R. (2000). The ROOT MERISTEMLESS1/CADMIUM SENSITIVE2 gene defines a glutathione-dependent pathway involved in initiation and maintenance of cell division during postembryonic root development. *Plant Cell* **12**, 97-110.

Wang Q., Little C.H.A., Odéon P.C. (1997). Control of longitudinal and cambial growth by gibberellins and indole-3-acetic acid in current-year shoots of *Pinus sylvestris*. *Tree Physiol.* **17**, 715-721.

Willemsen V., Wolkenfelt H., de Vrieze G., Weisbeek P., Scheres B. (1998). The *HOBBIT* gene is required for formation of the root meristem in the *Arabidopsis* embryo. *Development* **125**, 521-531.

- Yamaguchi M., Fabian T., Sauter M., Bhalerao R.P., Schrader J., Sandberg G., Umeda M., Uchimiya H.** (2000). Activation of CDK-activating kinase is dependent on interaction with H-type cyclins in plants. *Plant J.: For Cell And Molecular Biology* **24**, 11-20.
- Yamaguchi M., Umeda M., Uchimiya H.** (1998). A rice homolog of Cdk7/MO15 phosphorylates both cyclin-dependent protein kinases and the carboxy-terminal domain of RNA polymerase II. *Plant J.: For Cell And Molecular Biology* **16**, 613-619
- Yang J., Bardes E.S., Moore J.D., Brennan J., Powers M.A., Kornbluth S.** (1998). Control of cyclin B1 localization through regulated binding of the nuclear export factor CRM1. *Genes Dev.* **12**, 2131-2143.
- Zhang H., Forde B.G.** (2000). Regulation of Arabidopsis root development by nitrate availability. *J. Exp. Bot.* **51**, 51-59.
- Zhang H., Jennings A., Barlow P.W., Forde B.G.** (1999). Dual pathways for regulation of root branching by nitrate., *Proc. Natl. Acad. Sciences U.S.A.* **96**, 6529-6534.
- Zhou Y., Wang H., Gilmer S., Whitwill S., Keller W., Fowke L.C.** (2002). Control of petal and pollen development by the plant cyclin-dependent kinase inhibitor ICK1 in transgenic Brassica plants. *Planta* **215**, 248-257.



Remerciements

Ce doctorat a été réalisé dans le laboratoire de physiologie de la différenciation végétale de l'U.S.T.L., dirigé par Monsieur le professeur **Jean Louis Hilbert**.

Je remercie Messieurs les professeurs **Rambour Serge** et **Inzé Dirk** pour avoir codirigé cette thèse ainsi que pour leurs conseils avisés.

Ma profonde gratitude s'adresse à Madame **Huss Brigitte**, qui a encadré ce travail et qui par ses connaissances, ses conseils et sa disponibilité, a largement contribué à la réussite de ce travail. Je la remercie également pour ses suggestions et ses avis critiques lors de la rédaction de ce manuscrit et des articles.

Je suis très reconnaissant envers Messieurs **Sallé Georges** et **Beeckman Tom**, pour leur participation, en tant que rapporteurs, à mon jury de thèse.

Je tiens à saluer les maîtres de conférences et les étudiants du laboratoire parmi lesquels j'aimerais particulièrement citer, Madame **Blervacq Anne sophie** (pour ses conseils concernant la microscopie), Monsieur **Vuylsteker Christophe** (avec qui j'ai pris un réel plaisir à enseigner), Madame **Da Silva Sophie** (pour les différentes discussions qu'on a pu avoir tout au long de ce doctorat ainsi que pour m'avoir fourni le papier sur lequel j'ai imprimé une partie de mon DEA et de ma thèse, Courage sophie, il ne te reste que trois mois à tenir), Monsieur **Vazquez Franck** (pour son aide lors de ses expériences de RT-PCR semi-quantitatives en temps réel). Je n'oublie pas les autres : **David, Matthieu, Sylvain, Sophie, Clara, Magalie, Fathia**, sachez que je suis un jeune homme qui souhaite à tous de parvenir à vos fins.

Je tiens à exprimer ma sympathie envers le personnel du laboratoire : **Christelle, Viviane, Philippe, Marie Christine, Danièle**, pour l'aide qu'ils m'ont apportée.

Je n'aurais oublié mes parents, **Maryvonne et Richard**, ma sœur, **Maité**, ma compagne, **Maryline**, ainsi que les deux petits bouts de choux, **Robin et Lucie**, qui ont débarqué dans ma vie, pour mon plus grand bonheur, un jour de Février 2000, je vous

embrassetoustrèsfort. Jevousremercievivementparla
présentationdecemémoire.

Enfin, j'aimeraisdetoutcœur dédiércemanuscrità
Monsieur **De Beir Julien**, mon grand _père maternel, età **Madame**
Poulain Suzanne, magrand -mère paternelle, quinousont
malheureusementquittétroptôt. Mamy, Pépé, j'aurais, lejourde
lasoutenance, unetrèsgrossepenséepourvous.

Résumé

La chicorée de Bruxelles est une plante bisannuelle de la famille des Astéracées. Elle présente la particularité de développer une racine pivot tubérisée, lieu de synthèse et de stockage de l'inuline.

L'étude de l'implication des divisions cellulaires dans les différents événements du développement du système racinaire de la chicorée a été réalisée par l'observation de l'activité des promoteurs de deux cyclines mitotiques, At ;CycB1;1 et At ;CycA2;1. L'activité de pCycB1;1 a été corrélée avec les événements mitotiques tout au long du développement de la racine. Elle a ainsi pu être localisée au cœur des méristèmes racinaires et caulinaires lors de la germination et de la croissance en longueur de la racine, lors des différentes phases de la formation des racines latérales ainsi qu'au niveau de la zone cambiale produisant les tissus vasculaires secondaires. Cependant, une activité de ce promoteur a été mise en évidence dans des cellules différenciées du cortex, de l'endoderme et du péricycle, dans lesquelles aucune division n'a été observée. Ces dernières cellules semblent donc être réactivées au cours du développement de la racine. La cycline A2;1 présente un profil d'expression qui n'est pas strictement lié à la division cellulaire. En effet, l'activité du promoteur pCycA2;1 est retrouvée, tout au long du développement primaire de la racine de chicorée dans tous les tissus, à l'exception des cellules de la coiffe et de ce qui pourrait être le centre quiescent. La majeure partie des cellules de la racine de chicorée semble donc garder une compétence à se diviser. En effet, lors de la croissance en épaisseur de la racine de chicorée, les divisions de cellules du cortex, de l'endoderme et du péricycle permettent d'accompagner l'augmentation du diamètre de la racine

Un ADNc d'un premier gène de chicorée, nommé Ci;CycB1;1, codant une cycline mitotique de type B1 a été isolé et caractérisé. L'expression de ce gène est corrélée avec la transition G2/M du cycle cellulaire. Dans des suspensions cellulaires de chicorée, ce gène s'exprime spécifiquement au moment où les cellules sont en division active.

Mots clés : *Cichorium intybus*, développement, racine, racines latérales, cambium vasculaire, cycle cellulaire, cyclines.

Discipline : Stratégie d'exploitation des fonctions biologiques.

Adresse : Laboratoire de Physiologie de la Différenciation Végétale, Bâtiment SN2, 3^{ème} étage, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex.