

30376
2004
215

N° d'ordre: 3559

Université des Sciences et Technologies de Lille



THESE

Présentée pour l'obtention du grade de
Docteur en Sciences de l'Université de Lille 1
Stratégies d'Exploitation des Fonctions Biologiques
par

Sophie DA SILVA

**Identification des gènes *CiSTM* et *CiCLV1p* chez *Cichorium intybus*.
Implication potentielle dans les modifications d'identité cellulaire au cours
des phases précoces de l'embryogenèse somatique et du développement des
embryons zygotiques et de la graine.**

Soutenue le 15 décembre 2004, devant la commission :

M. P. Gallois	Professeur, Université de Manchester	Rapporteur
M. J.-L. Verdeil	Directeur de recherches, CIRAD Montpellier	Rapporteur
M. J.-L. Hilbert	Professeur, USTL	Examineur
Mme A.-S. Blervacq	Maître de conférences, USTL	Examineur
Mme M.-C. Quillet	Maître de conférences, USTL	Examineur

Remerciements

Tout d'abord, je remercie Monsieur le Professeur Jacques Vasseur qui m'a confié un sujet de DEA puis un sujet de thèse. J'associe à ces remerciements Monsieur le Professeur Jean Louis Hilbert qui lui a succédé et a ensuite accepté de devenir mon directeur de thèse et de corriger ce manuscrit.

Je remercie Messieurs Patrick Gallois et Jean Luc Verdeil qui ont accepté de donner un peu de leur temps afin de juger cette thèse.

Je remercie Marie Christine Quillet, qui m'a encadré durant toutes ces années de thèse, pour les discussions scientifiques, pour les corrections précises du manuscrit et pour son soutien moral dans les derniers moments de la rédaction. Je n'oublierai pas ces années...

Un merci particulier à Anne Sophie Blervacq qui a non seulement largement contribué à l'étude cytologique mais qui m'a chaleureusement encouragée pour que je termine ce travail. Nos discussions scientifiques et "maternelles" m'ont beaucoup apportée ! Qu'elles durent encore longtemps.

J'adresse également mes remerciements à l'ensemble de maîtres de conférence du laboratoire, et en particulier à Bruno Delbreil qui m'a trouvé une salle de soutenance et à Théo Hendricks, traducteur officiel du laboratoire.

Mes remerciements vont aussi à l'ensemble du personnel technique qui contribue largement à la bonne marche du laboratoire. Je ne peux oublier Marcelle Auger et Viviane Thint qui étaient là à mon arrivée et avec qui j'ai partagé de très bons moments.

J'ai bien sûr une pensée spéciale pour tous les anciens du laboratoire, Jeff, Olivier, Axelle, Eric, Delphine, Anne, Béatrice, Rachel, Jérôme (dans le désordre) qui ont fini depuis bien longtemps mais qui me laissent des souvenirs inoubliables. Bonne route à tous.

Et puis, il y a les compagnons de laboratoire actuels merci à tous : Christelle, pour toutes ces discussions et ces confidences écoutées, Clara pour les petits dépannages informatiques et autre vérification..., Valérie pour tes encouragements, et Matthieu, qui termine aussi, bon courage pour la suite.

Merci à mes collègues de bureau : Franck, David, Sophie A., Sylvain. Bon courage aux petits nouveaux.

Je tiens particulièrement à remercier Bruno Milhau, doyen de la Faculté Libre des Sciences et Techniques de Lille qui m'a fait confiance et m'a intégrée à son équipe pédagogique. Je remercie aussi Laetitia et Cédric pour leur gentillesse et leur soutien.

J'ai gardé le meilleur pour la fin : ma famille qui m'a énormément entourée ces dernières semaines ! Cette thèse a pu être terminée grâce à vous tous, quand vous vous êtes si bien occupés des filles. J'ai bien sûr une

pensée particulière pour Maman et Manande qui gèrent au quotidien mes enfants et beaucoup d'autres choses. Stéphanie, Mélanie et Thomas, merci pour vos encouragements.

Et puis, il y a mon petit mari Filipe qui a fait preuve d'une grande patience et qui m'a apporté tout le réconfort dont j'avais besoin. Merci pour ton aide. Enfin, mes petites puces Zoé et Lila, merci pour vos jolis sourires qui aident à oublier les petits soucis. A tous les trois, je vous dédie cette thèse.

SOMMAIRE

Introduction	p 1
Etude bibliographique	p 5
1. L'embryogenèse somatique	p 6
1.1. L'embryogenèse somatique : caractéristiques générales	p 6
1.1.1. Définition	p 6
1.1.2. Les marqueurs de l'embryogenèse somatique	p 8
1.2. L'embryogenèse somatique directe chez la chicorée	p 11
1.2.1. La chicorée	p 11
1.2.2. L'embryogenèse somatique chez la chicorée hybride "474"	p 13
1.2.3. Les marqueurs de l'embryogenèse somatique chez la chicorée	p 14
2. Fonctionnement du méristème apical et caractérisation de mutants affectés dans la formation et le maintien du méristème	p 15
2.1. Le méristème	p 15
2.1.1. Formation du méristème	p 16
2.1.2. Organisation des méristèmes	p 16
2.2. Les mutants du MAC : caractérisation, clonage et expression des gènes	p 17
2.2.1. Caractérisation phénotypique des mutants	p 18
2.2.2. Clonage et caractérisation moléculaire des gènes	p 25
2.2.3. Caractérisation de l'expression spatio-temporelle des gènes	p 26
3. Modèle de fonctionnement du MAC	p 31
Matériel et Méthodes	p 33
1. Matériel végétal	p 34
2. Conditions de culture <i>in vitro</i>	p 36
1.2. Maintien du matériel végétal par embryogenèse somatique et par organogenèse	p 36
2.1.1. Embryogenèse somatique	p 36
2.1.2. Organogenèse	p 36
1.3. Mise en culture de fragments de feuilles et de racines destinées aux manipulations	p 37
3. Réalisation d'une cinétique d'embryogenèse zygotique	p 37
4. Techniques relatives au clonage des ADNc	p 38
4.1. Extraction des ARN totaux.	p 38
4.2. Définition des amorces dégénérées destinées au clonage des séquences partielles des gènes candidats <i>CiSTM</i> et <i>CiCLV1p</i>	p 38
4.3. La transcription inverse	p 39
4.4. Amplification des ADNc avec les amorces dégénérées	p 39
4.5. Ligature des produits de PCR.	p 40

Sommaire

4.6. Transformation de bactéries compétentes.	p 40
4.7. Amplification des clones par PCR	p 41
4.8. Séquençage des fragments clonés	p 42
4.9. PCR inverse à partir de matrices ADNc	p 42
4.9.1. Synthèse du premier brin d'ADNc	p 42
4.9.2. Poly-adénylation des premiers brins d'ADNc	p 43
4.9.3. Synthèse des seconds brins d'ADNc	p 43
4.9.4. PCR non spécifique	p 44
4.9.5. Digestion des ADNc doubles brins	p 44
4.9.6. Autoligature des ADNc doubles brins	p 45
4.9.7. PCR inverse	p 45
4.10. Amplification des ADNc pleine longueur avec le kit Gene Racer™ (Invitrogen)	p 46
4.10.1. Purification ARN messagers	p 46
4.10.2. Déphosphorylation des messagers tronqués	p 46
4.10.3. Destruction de la coiffe des ARN messagers	p 47
4.10.4. Ligature de l'oligonucléotide ARN	p 47
4.10.5. Transcription inverse des ARNm	p 47
4.10.6. Amplification des extrémités 5' des ADNc	p 48
5. RT-PCR en Temps Réel	p 49
5.1. Principe de la technique	p 49
5.2. Protocole expérimental	p 50
6. Techniques de cytologie	p 51
6.1. Fixation, déshydratation et inclusion du matériel végétal	p 51
6.2. Coupes au microtome	p 52
6.3. Coloration des coupes	p 52
6.4. Observation microscopique et photographie	p 52
Résultats Discussion	p 53
1. Clonage des ADNc <i>CiSTM</i> et <i>CiCLV</i>	p 54
1.1. Clonage de <i>CiSTM</i>	p 54
Etape 1 : Clonage d'un ADNc partiel <i>CiSTMEI</i>	p 54
Etape 2 : PCR inverse	p 55
1.2. Analyse de la séquence <i>CiSTM</i>	p 60
1.3. Clonage de <i>CiCLVlp</i>	p 63
Etape 1 : Obtention de l'ADNc partiel <i>CiCLVIEI</i>	p 63
Etape 2 : Allongement des séquences obtenues	p 64
Etape 3 phase 1 : RT spécifique de <i>CLVgr3</i> et 5' RACE PCR	p 66
Etape 3 phase 2 : 5' RACE réalisée avec le kit de Gene Racer	p 68
1.4. Analyses de la séquence <i>CiCLVI</i>	p 69
Discussion	p 72

2. Observations cytologiques	p 75
2.1. Observation des coupes réalisées aux différents jours d'une cinétique de développement d'akènes de chicorée.	p 75
2.2. Etablissement d'un référentiel de figures cytologiques observées chez les nouveaux génotypes au cours de la culture en condition embryogène.	p 77
2.3. Méthode de comptage	p 79
2.4. Comparaison des figures de réactivation observées chez le génotype K59 cultivé en absence ou en présence de glycérol.	p 80
2.5. Observation des figures de réactivation de fragments foliaires au quatrième jour chez des génotypes issus de l'autofécondation de K59.	p 83
2.6. Caractérisation des figures cytologiques observées au cours de la culture de fragments foliaires du génotype C15.	p 84
2.7. Caractérisation des figures cytologiques observées au cours de la culture de fragments racinaires du génotype K59 en absence de glycérol.	p 85
2.8. Caractérisation des figures cytologiques observées au cours de la culture de fragments racinaires du génotype C15 en absence de glycérol.	p 86
3. Etude du profil d'expression des transcrits <i>CiCLV1</i> et <i>CiSTM</i> par RT-PCR en temps réel	p 87
3.1. Analyse des résultats	p 87
3.2. Etude de l'expression des transcrits <i>CiCLV1</i> et <i>CiSTM</i> au cours de l'embryogenèse zygotique chez la chicorée	p 90
Accumulation des transcrits <i>CiCLV1</i>	p 90
Accumulation des transcrits <i>CiSTM</i>	p 91
Comparaison des niveaux de transcrits <i>CiSTM</i> et <i>CiCLV1</i> au cours de l'embryogenèse zygotique	p 91
3.3. Etude de l'expression des transcrits <i>CiCLV1</i> et <i>CiSTM</i> au cours de l'embryogenèse somatique chez les génotypes K59 et C15	p 91
Accumulation des transcrits <i>CiCLV1</i> dans les feuilles des génotypes C15 et K59	p 91
Accumulation des transcrits <i>CiSTM</i> dans les feuilles des génotypes C15 et K59	p 92
Comparaison des niveaux de transcrits <i>CiSTM</i> et <i>CiCLV1</i> chez le génotype K59	p 93
Comparaison de la QR des transcrits <i>CiSTM</i> et <i>CiCLV1</i> entre les processus d'embryogenèse somatique et zygotique	p 93

Sommaire

Discussion	p 95
Conclusion Perspectives	p 102
Références bibliographiques	p 106
Annexes	p 115

INTRODUCTION

Introduction générale

Le travail présenté s'intègre dans le cadre d'un programme d'étude des mécanismes de dédifférenciation et redifférenciation permettant d'obtenir des embryons somatiques à partir de différents tissus de chicorée cultivés *in vitro*. Au cours de l'embryogenèse somatique de la chicorée, des cellules différenciées de feuilles ou de racines en condition de culture embryogène se dédifférencient, reviennent à un état de cellules indifférenciées, que l'on qualifie de réactivées. Ces cellules s'engagent alors vers un nouveau programme de division qui permet l'obtention d'un embryon somatique. Au cours de cette réorientation, l'identité cellulaire va changer et la cellule va subir de nombreuses divisions.

Ces modifications d'identité cellulaire peuvent être comparées à ce que l'on observe dans les méristèmes apicaux caulinaires, inflorescentiels et floraux. En effet, il existe dans ces méristèmes une population de cellules souches qui possèdent deux fonctions : maintien d'un pool de cellules indifférenciées et édification d'organes à partir des régions périphériques des méristèmes, la région basale du méristème sert à l'édification de la tige. Ces cellules vont donc subir un changement de leur identité. La régulation du maintien du méristème est sous contrôle génique et le mécanisme est de mieux en mieux connu (Veit, 2004).

Les études de Mordhorst (Mordhorst *et al.*, 1998) ont aussi corrélé l'apparition d'embryons somatiques chez *Arabidopsis thaliana* à des mutations de gènes contrôlant la division cellulaire au sein du méristème. Dans une première étude, des embryons somatiques ont été obtenus à partir d'embryons zygotiques des mutants *pt* (*primordia timing*), *clv1* (*clavata1*) et des doubles mutants *pt/clv1*. Ces embryons zygotiques mutants possèdent des méristèmes apicaux embryonnaires plus grands.

Ces résultats et les connaissances cytologiques sur l'obtention des embryons somatiques chez la chicorée ont alors orienté notre travail vers l'approche gène candidat en cherchant à savoir si des gènes tels que *CLAVATA1* (*CLV1*) et *SHOOTMERISTEMLESS* (*STM*), responsables de l'intégrité de la structure du méristème, pouvaient jouer un rôle au cours de l'embryogenèse somatique et plus particulièrement au cours des phases précoces du mécanisme. Le choix des gènes candidats a de même été déterminé pour partie par les données de séquences dont nous disposons dans les banques de données et avec lesquelles il était possible de définir des blocs de séquences conservées. Ces blocs serviraient ensuite à la définition d'amorces dégénérées.

Introduction générale

Au sein du MAC (Méristème Apical Caulinaire), il existe plusieurs régulateurs dont les protéines : CLV1, CLV2, CLV3, STM, WUSHEL (WUS) et ZLL (ZWILLE).

Les séquences protéiques bien caractérisées au début de l'étude étaient celles de CLV1 et STM chez *Arabidopsis thaliana*. D'autre part, ces séquences se prêtaient bien à l'étude puisque CLV1 appartient au groupe des récepteurs à activité kinase dont les domaines kinases sont assez bien conservés et STM appartient à la classe I des protéines "KNOTTED-like", qui possèdent des régions très conservées au niveau du domaine ELK, du domaine basique, et de l'homéodomaine. Les séquences de CLV2 et CLV3 ne permettaient pas d'établir des blocs de séquences conservées, CLV3 n'étant pas encore cloné et ne montrant par la suite aucune similarité avec d'autres séquences et CLV2 étant majoritairement composée de LRR (Leucine Rich Repeat) pas toujours très conservées à l'exception des positions des résidus leucine. Peu de données concernant les homologues des séquences de WUS et ZLL étaient disponibles au début de cette étude.

La seconde étape de cette étude a alors été de cloner des séquences partielles des ADNc pour lesquels nous avons défini des amorces dégénérées puis de cloner les ADNc pleine longueur grâce à différentes stratégies.

La troisième étape de notre démarche a ensuite été si ces candidats étaient exprimés au cours de l'embryogenèse somatique de la chicorée et de voir si cette expression était différentielle afin de pouvoir comparer ce profil d'expression aux figures cytologiques obtenues après culture des nouveaux génotypes embryogènes et non embryogènes sélectionnés au laboratoire.

En effet, dans le but d'appréhender les mécanismes moléculaires fins impliqués dans le déterminisme de l'embryogenèse somatique de la chicorée, il est important de disposer de génotypes embryogènes et non embryogènes les plus isogéniques possible. Ainsi, un fond génétique homogène permettra d'identifier avec une meilleure spécificité les gènes dont l'expression est associée à la réponse embryogène.

Plusieurs tentatives infructueuses ont été réalisées afin d'obtenir en nombre suffisant de descendants du génotype 474 (matériel utilisé jusqu'alors au laboratoire). Du fait de son statut interspécifique, l'hybride "474" est pratiquement stérile, avec une viabilité du pollen estimée à moins de 10 % (coloration par le réactif d'Alexander) et une fertilité femelle quasiment nulle, même après pollinisation par des individus de *C. intybus* parfaitement fertiles (B. Delbreil et M.C. Quillet, communication personnelle). Dans ces conditions, le caractère embryogène a été recherché parmi les génotypes parentaux à l'origine du clone 474. Le

Introduction générale

second objectif des travaux présentés ici a consisté au choix du matériel le plus et le moins embryogène puis à la caractérisation cytologique des génotypes sélectionnés.

En parallèle à cette étude de caractérisation de gènes candidats au cours de l'embryogenèse somatique chez la chicorée, le troisième objectif de ce travail était une comparaison de l'embryogenèse somatique et zygotique chez la chicorée. En effet, les gènes *CLVI* et *STM* sont exprimés au cours de l'embryogenèse zygotique et du développement post embryonnaire chez *Arabidopsis thaliana*. Pour les candidats identifiés chez la chicorée, nous voulions valider ces résultats non seulement par une comparaison de séquences et une analyse de phylogénie, mais aussi par une comparaison des profils d'expression des transcrits au cours de l'embryogenèse zygotique de la chicorée. Nous avons donc caractérisé une cinétique d'embryogenèse zygotique et suivi le profil d'expression de nos candidats au cours de cette cinétique.

Le premier chapitre de ce manuscrit est consacré à une étude bibliographique séparée en deux parties. La première partie décrit l'embryogenèse somatique et notamment l'embryogenèse somatique chez la chicorée. La seconde partie de l'étude bibliographique présente les connaissances actuelles sur le fonctionnement du méristème et une étude des mutants affectés dans la formation du méristème chez *Arabidopsis thaliana*.

Le matériel végétal et les méthodes seront détaillées dans un second chapitre.

Les résultats seront découpés en trois parties. La première partie détaillera les différentes étapes du clonage de nos candidats. La seconde partie présentera les résultats cytologiques de la caractérisation du nouveau matériel d'étude et la cinétique d'embryogenèse zygotique de la chicorée. La troisième partie de ce chapitre sera consacrée à l'étude de l'expression de nos candidats au cours de l'embryogenèse somatique chez les génotypes nouvellement caractérisés et cours de l'embryogenèse zygotique de la chicorée. Les résultats seront discutés au fur et à mesure de leur présentation.

Une conclusion générale et des perspectives viendront conclure ce manuscrit.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Etude bibliographique

Chez les végétaux, la multiplication d'une espèce est assurée de deux manières : la reproduction sexuée, qui est la voie classique et commune avec le règne animal, et la multiplication végétative.

La reproduction sexuée aboutit à la formation d'un zygote à $2n$ chromosomes, issu de la fusion de gamètes à n chromosomes provenant du même ou de deux individus différents. Le zygote diploïde se développe au sein des tissus maternels en embryon qui est génétiquement différent de ses parents.

Ce mode de reproduction permet d'obtenir de la variabilité génétique, ce qui est essentiel pour la survie et l'adaptation des espèces dans des conditions environnementales variées. Chez certaines espèces, la production de graines par voie sexuée ne nécessite pas toujours l'intervention d'un second individu. En effet, certaines plantes hermaphrodites comme la tomate, le blé sont capables d'autofécondation. Les individus obtenus seront alors identiques à la plante mère, dans le cas de lignées.

Contrairement au règne animal, et hormis quelques invertébrés, pour lesquels la reproduction sexuée est le seul moyen naturel de pérennité de l'espèce, les végétaux ont la capacité de se reproduire par d'autres voies telle que la reproduction asexuée.

Les voies de multiplication asexuée existent de manière spontanée dans la nature par production de stolons, de bulbilles, ou par apomixie et permettent le développement *in vivo* d'un individu sans fécondation.

Des embryons peuvent aussi être obtenus *in vitro* par différents processus comme l'embryogenèse haploïde (androgenèse ou gynogenèse) ou l'embryogenèse somatique.

1. L'embryogenèse somatique

1.1. L'embryogenèse somatique : caractéristiques générales

1.1.1. Définition

L'embryogenèse somatique correspond à un ensemble de phases de développement qui aboutissent à la formation d'un embryon somatique. L'obtention de ces embryons *in vitro* n'est

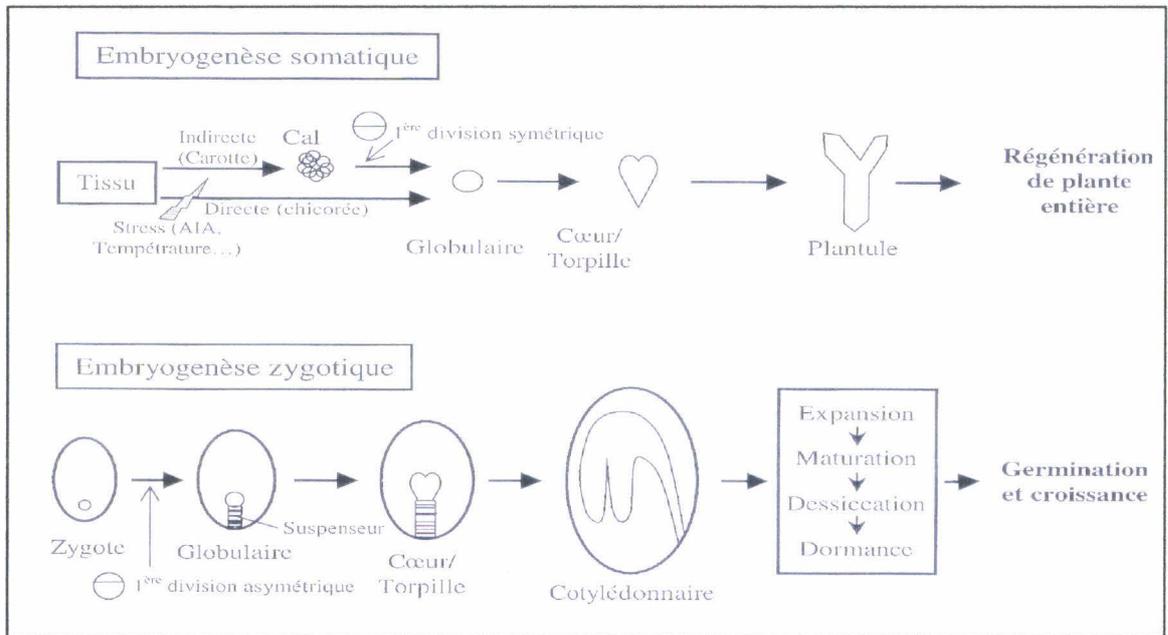


Figure 1: Comparaison des stades de l'embryogenèse somatique et zygotique (Zimmerman, 1993)

Etude bibliographique

possible que grâce à la capacité des cellules à régénérer, dans certaines conditions, des individus complets à partir d'une seule cellule ou d'un groupe de cellules. Cette propriété remarquable est possible grâce à la totipotence cellulaire, propre au monde végétal.

Suivant la nature du tissu initiateur, différents types d'embryogenèse sont inductibles : des cellules sexuelles isolées peuvent changer leur programme de développement et être à l'origine d'embryons haploïdes : il s'agit de gynogenèse ou d'androgenèse. Après doublement du stock chromosomique, des homozygotes parfaits sont obtenus.

De même, à partir d'une cellule ou d'un tissu somatique (feuille, racine, style...), des embryons diploïdes peuvent être obtenus par embryogenèse somatique. Ce processus permet d'obtenir des individus génétiquement identiques à la plante mère.

Le premier modèle d'embryogenèse somatique fut celui proposé chez la carotte par Steward et Reinert (Steward *et al.*, 1958 et Reinert, 1959). Cette découverte fut d'une grande importance car elle permet en principe de conserver le patrimoine génétique de plantes d'intérêt agronomique et horticole (camélia, gerbera, cyclamen) en diminuant les coûts de production et en accélérant la vitesse de régénération des plantes par rapport aux techniques classiques de multiplication végétative.

Chez la majorité des plantes, des comparaisons ont montré des similitudes importantes entre le développement des embryons zygotiques et les embryons somatiques (Zimmerman, 1993 ; Dodeman *et al.*, 1998). Ces similitudes sont représentées sur la figure 1 en comparant les stades de l'embryogenèse somatique et zygotique.

L'embryogenèse somatique permet d'obtenir une plante entière à partir d'une cellule ou d'un groupe de cellules selon un processus qui se déroule suivant trois phases successives : induction, expression et maturation.

La phase d'induction débute par une étape de dédifférenciation (ou réactivation cellulaire) au cours de laquelle certaines cellules, composant un tissu différencié, se dédifférencient suite à des modifications du programme génétique dans lequel elles sont engagées.

Le devenir des cellules dédifférenciées diffère selon qu'il s'agit d'une embryogenèse somatique directe ou indirecte. Lors d'une embryogenèse somatique directe comme dans le cas de la chicorée (Guedira *et al.*, 1989 ; Dubois *et al.*, 1991), certaines cellules réactivées acquièrent une compétence à l'embryogenèse. Komamine (1992) a défini la notion de

Etude bibliographique

compétence à l'embryogenèse comme la capacité des cellules à acquérir une identité de cellules embryogènes en réponse à des stimuli externes. Les cellules devenues embryogènes n'ont alors plus besoin de l'application de ces stimuli pour se diviser et se développer en embryons somatiques. L'état embryogène pour une cellule marque un état transitoire entre les phases d'induction et d'expression de l'embryogenèse.

L'embryogenèse somatique indirecte décrite chez la carotte (De Vries *et al.*, 1988) comporte une étape de prolifération des cellules dédifférenciées. Ces cellules forment des calcs appelés aussi masses pro-embryogènes. Seul un nombre limité des cellules qui forment ces masses pro-embryogènes acquièrent une compétence à l'embryogenèse, évoluent en cellules embryogènes et sont capables de devenir des embryons somatiques.

Chez la carotte, l'embryogenèse somatique est d'origine unicellulaire (Toonen *et al.*, 1994), c'est à dire que chaque embryon est issu d'une cellule embryogène. En revanche, chez l'hévéa (Michaux-Ferrière *et al.*, 1992), qui présente aussi un mode d'induction indirect de l'embryogenèse somatique, l'origine des embryons somatiques est pluricellulaire.

La phase d'expression de l'embryogenèse somatique débute par la division des cellules embryogènes et se poursuit jusqu'au stade cotylédonnaire.

Une phase de maturation plus ou moins longue des embryons permet l'accumulation des composés de réserve indispensables au développement ultérieur des jeunes plantules.

1.1.2. Les marqueurs de l'embryogenèse somatique

La réinitiation du programme génétique des cellules au cours de l'embryogenèse somatique implique l'intervention de gènes clés, que se soit lors du passage de l'état de cellule différenciée vers l'état de cellule dédifférenciée, ou du passage de l'état de cellule dédifférenciée vers l'obtention d'embryons somatiques.

Modifications cytologiques

De nombreuses études concernant l'embryogenèse somatique ont mis en évidence des modifications communes aux cellules réactivées (dédifférenciées) à l'origine des embryons somatiques :

- rapport nucléoplasmique élevé,
- noyau à nucléole volumineux,
- cytoplasme dense en ribosomes.

Etude bibliographique

Marqueurs protéiques

Marqueurs protéiques tissulaires

L'identification de marqueurs protéiques au cours du processus d'embryogenèse somatique est possible en comparant l'accumulation des protéines à différents stades de la culture.

Les premiers travaux sur l'embryogenèse somatique de la carotte ont mis en évidence une accumulation différentielle de protéines. En effet, deux protéines de 77 et 43 kDa sont détectées avant la formation des embryons globulaires mais ne sont pas présentes dans les cals en conditions non embryogènes (Sung, 1981). Deux polypeptides de masses moléculaires similaires à ceux identifiés chez la carotte ont été mis en évidence dans des nodules embryogènes de pois (Stirn et Jacobsen, 1987).

Aux stades tardifs de l'embryogenèse somatique de la carotte, les comparaisons des profils d'expression protéique de l'embryogenèse somatique et zygotique ont montré que de nombreuses protéines étaient communes aux deux processus, beaucoup appartenant au groupe des LEA (Late Embryogenesis Abundant) (Zimmerman, 1993).

Des études ont montré que durant le processus embryogène, des protéines connues pour être en relation avec les phénomènes de stress pouvaient être présentes. Des accumulations de HSP (Heat Shock Proteins) ont été décrites lors de l'embryogenèse somatique de la luzerne (Gyorgyey *et al.*, 1991).

Plus récemment, une protéine phosphorylée a été identifiée et est présente en condition de stress induisant l'embryogenèse somatique chez la carotte (Tan *et al.*, 2000). Cette protéine n'est pas phosphorylée dans les cultures contrôles sans condition de stress. Il est important de noter que l'induction de l'embryogenèse somatique n'induit pas seulement une accumulation de protéines mais aussi des modifications post traductionnelles de protéines synthétisées de façon constitutive.

Marqueurs protéiques extracellulaires

La majorité des études concernant l'identification de marqueurs protéiques au cours de l'embryogenèse somatique a été réalisée à partir de protéines qui s'accumulent dans le milieu de culture. En effet, le nombre de protéines différentes relarguées dans les milieux de culture est réduit par rapport à la grande diversité des protéines tissulaires, ce qui facilite

l'interprétation des résultats.

Ainsi, chez la carotte la présence de plusieurs protéines glycosylées est associée au phénomène d'embryogenèse somatique (De Vries *et al.*, 1988b ; De Jong *et al.*, 1992). Le rôle de ces protéines n'est pas totalement élucidé mais leur ajout à des milieux de culture de lignées cellulaires non embryogènes peut induire l'embryogenèse somatique (De Vries *et al.*, 1989 ; Lo Schiavo *et al.*, 1990).

De plus, des protéines de type arabino-galactanes (AGP : Arabino Galactan Proteins) sont capables d'induire l'apparition de cellules embryogènes dans une suspension cellulaire non embryogène de carotte (Kreuger et Van Holst, 1993). D'autres glycoprotéines ont été mises en évidence chez le pin grâce à l'analyse des protéines des milieux de culture de 4 lignées embryogènes et de 2 lignées non embryogènes (Domon *et al.*, 1994). Parmi ces glycoprotéines, le polypeptide GP11 semble spécifique de l'embryogenèse somatique, et présente de fortes homologies avec une germine du blé (Domon *et al.*, 1995).

Marqueurs moléculaires

De nombreuses espèces sont capables d'induire des embryons somatiques *in vitro*. Cependant, les mécanismes précoces d'induction et donc les gènes intervenant au cours des phases précoces restent encore mal connus. Un des obstacles est le faible nombre de cellules réactivées et le manque d'accessibilité de celles-ci. En effet, au sein d'un tissu ou d'un cal, seule une minorité de cellules deviennent compétentes à l'embryogenèse somatique, puis embryogènes.

En 1997, Schmidt *et al.* ont mis en évidence l'expression différentielle d'un gène codant un récepteur potentiel à activité sérine/thréonine kinase au cours de l'embryogenèse somatique de la carotte par la technique de DD-RT-PCR (Differential Display-Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction). Le récepteur SERK (Somatic Embryogenesis Receptor-like Kinase) est une protéine de 553 acides aminés et est caractérisé par un domaine NH₂-terminal extracellulaire comprenant 5 régions riches en leucine (LRR : Leucine Rich Repeat). Ce domaine est potentiellement impliqué dans la liaison d'un ligand protéique. La présence dans le domaine extracellulaire de SERK d'une séquence consensus parfaitement conservée riche en proline (SPPPP), présente dans les extensines et dans les protéines arabino-galactanes, suggère une interaction avec des composés de la paroi végétale. SERK possède de plus un domaine trans-membranaire et un domaine intracellulaire composé de 11 domaines caractéristiques de l'activité sérine-thréonine kinase. Ce récepteur SERK est exprimé dès l'état

Etude bibliographique

de cellule compétente jusqu'au stade d'embryon globulaire contenant 100 cellules. Cette expression transitoire est cohérente avec l'hypothèse que la protéine SERK pourrait faire partie de la transduction du signal d'une molécule excrétée dans le milieu de culture et déclencherait le développement embryogène, ce dernier ne se déclenchant pas dans les cellules voisines n'exprimant pas SERK.

Chez le dactyle (*Dactylis glomerata* L), un gène de type *SERK* est aussi exprimé dans une population de cellules riches en cytoplasme, dites compétentes, après mise en culture de fragments foliaires en conditions embryogènes. Contrairement à la carotte, le gène *SERK* continue à être exprimé, par exemple dans le méristème apical, au cours des phases tardives de l'embryogenèse somatique (Somleva *et al.*, 2000).

Lors des phases tardives de l'embryogenèse somatique et zygotique, chez la carotte, 6 gènes à homéodomaines (*CHBs*) ont été isolés à partir d'embryons et de graines (Kawahara *et al.*, 1995). Les analyses northern Blot ont montré que 4 d'entre eux (*CHB3*, *CHB4*, *CHB5* et *CHB6*) avaient leur transcription qui augmentait au cours du développement des embryons somatiques. Des études ont confirmé ces premiers résultats en révélant de plus le profil d'expression spatial et temporel des quatre gènes *CHB* dans les embryons somatiques par la technique d'hybridation *in situ*. La différence d'expression « organe spécifique » entre *CHB3*, *CHB4* et *CHB5* n'est visible qu'à partir du stade torpille de l'embryon somatique. Les ARNm de *CHB6* s'accumulent dans les cellules du procambium et seraient donc associés à la différenciation ou au maintien du système vasculaire. En résumé, différents gènes à homéodomaine chez la carotte sont associés spécifiquement à la différenciation des tissus et à la formation des organes au cours de l'embryogenèse somatique (Hiwatashi *et al.*, 2000).

1.2. L'embryogenèse somatique directe chez la chicorée

1.2.1. La chicorée

Répartition des espèces

Le genre *Cichorium* regroupe une dizaine d'espèces plus ou moins bien caractérisées localisées en Europe continentale et dans le bassin méditerranéen (Shicheva, 1936). Il existe majoritairement trois espèces diploïdes en Europe ($2n=18$). Ces trois espèces sont :

Cichorium endivia L., *Cichorium intybus* L., et *Cichorium spinosum* L.

Etude bibliographique

Cichorium endivia L.

Ces chicorées annuelles sont retrouvées dans le sud de l'Europe et au nord de l'Afrique. Parmi elles, la Scarole et la Frisée sont sélectionnées depuis l'Antiquité pour la consommation des feuilles en salades.

Cichorium intybus L.

A l'état sauvage, on rencontre *Cichorium intybus* au bord des chemins, dans les près et les espaces incultes. Selon leur origine géographique, les populations naturelles de *Cichorium intybus* ont un cycle de vie variable avec des formes annuelles, bisannuelles ou pérennes. Toutes les chicorées sélectionnées par l'homme ont un cycle de vie bisannuel.

On distingue différents cultigrupes cultivés soit pour leurs feuilles soit pour leurs racines :

- les chicorées cultivées au champ pour la récolte des racines. On trouve parmi elles les chicorées industrielles utilisées pour la torréfaction et la production d'inuline.
- les chicorées cultivées en champ pour la récolte des feuilles. Ces feuilles peuvent être consommées crues : Pain de Sucre (verte), Chioggia (vertes, rouges, panachées) ou consommées après cuisson comme la Catalogne
- les chicorées cultivées au champ puis forcées dont la plus célèbre est la Chicorée Witloof ou de Bruxelles, appelée encore endive ou chicon. On trouve aussi dans ces cultigrupes la Trévis (rouge), la Castelfranco (panachée) et la Barbe de Capucin.

Cichorium spinosum L.

Ces chicorées sont rencontrées dans les pays méditerranéens comme l'Espagne ou la Grèce sous la forme d'arbrisseaux nains. Leur ramification les plus extérieures sont piquantes et leur feuilles étroites et moins charnues constituent un signe d'adaptation à la sécheresse.

Un peu d'histoire...

La chicorée (*Cichorium intybus* L.) fut d'abord récoltée à l'état sauvage comme plante médicinale (dépurative) et comme légume. Elle apparaît parmi les plantes cultivées dans les potagers de Charlemagne, mais la culture en vue de l'alimentation ne s'est développée qu'à partir du XVII^{ème} siècle.

La chicorée sauvage cultivée dans les jardins est à l'origine d'un produit étiolée : la Barbe de Capucin. C'est en 1751 que ce mode de culture est mentionné pour la première fois. L'infusion faite avec la racine torréfiée et pulvérisée d'une de ses variétés était déjà connu en Hollande vers le milieu du XVIII^{ème} siècle mais son emploi en France ne date vraiment que du début du XIX^{ème} siècle, lorsque le blocus continental détermina une augmentation considérable du prix des denrées coloniales, et du café principalement.

1.2.2. L'embryogenèse somatique chez la chicorée hybride "474"

Chez la chicorée "474", hybride inter-spécifique issu d'un croisement entre *C. intybus* L. et *C. endivia* L., les premiers embryons somatiques ont été obtenus à partir d'organes reproducteurs immatures tels que des styles (Dubois *et al.*, 1988) et les anthères (Guedira *et al.*, 1989). Par la suite d'autres tissus provenant de cultures *in vitro* se sont révélés inductibles pour l'obtention des embryons somatiques telles que les racines (Dubois *et al.*, 1990) et les feuilles (Dubois *et al.*, 1991). D'autre part, l'embryogenèse somatique est directe et unicellulaire. En effet, il n'y a pas de passage par un stade cal (Dubois *et al.*, 1991; Blervacq *et al.*, 1995).

L'utilisation de glycérol dans le milieu de culture (330 mM) au cours de la phase d'induction permet une synchronisation relative de la première division des cellules embryogènes des tissus foliaires (Robatche-Claive *et al.*, 1992). Chez la chicorée, la première division de la cellule embryogène, visible 4 jours après la mise en culture, est symétrique et anticline par rapport à l'orientation des faisceaux conducteurs (Blervacq *et al.*, 1995). La synchronisation obtenue améliore les conditions d'études biochimiques et moléculaires de l'embryogenèse somatique. Toutes les cellules considérées aux stades précoces de l'embryogenèse évoluent de façon relativement synchrone, il est ainsi plus facile de corréler un événement moléculaire à un stade cellulaire.

Un effet de la température au cours de la culture a aussi été observé. En effet, à 35°C, des embryons somatiques sont obtenus après 7 jours de culture de fragments de feuilles. En revanche, à 20 ou 25°C, seules des mitoses inorganisées et de la néotrachéogenèse au sein de cals sont induites, et plus tardivement des bourgeons (Décout *et al.*, 1994).

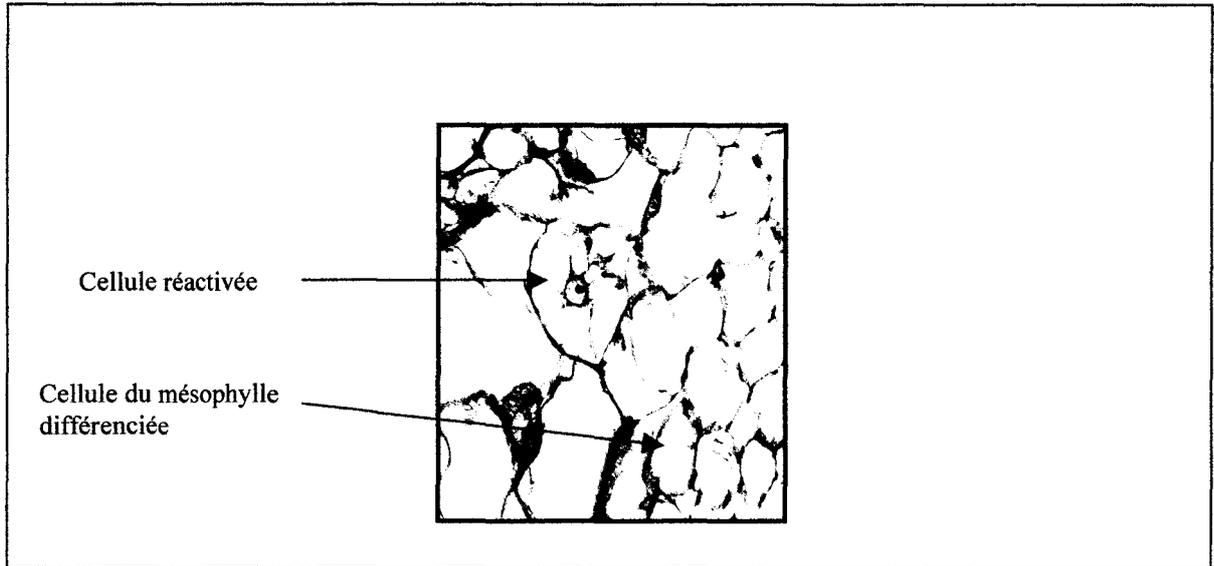


Figure 2 : Cellule réactivée sur un limbe foliaire de chicorée obtenue après 4 jours de culture sur milieu d'induction de l'embryogenèse somatique

1.2.3. Les marqueurs de l'embryogenèse somatique chez la chicorée.

Des modifications cytologiques apparaissent nettement dès le quatrième jour sur les tissus placés en conditions de culture embryogène (figure 2). Chez la chicorée, les cellules réactivées s'isolent les une des autres par un dépôt de callose au niveau des plasmodesmes, une modification des pectines de la lamelle moyenne et une augmentation de l'épaisseur de la paroi (Dubois *et al.*, 1990, 1992). Plus tardivement, un réseau fibrillaire est observé autour des embryons et serait de nature glycoprotéique (Dubois *et al.*, 1992). Ce réseau pourrait faire partie d'un complexe de polysaccharides-protéoglycanes, qui pourrait conditionner la coordination du développement précoce des embryons.

La figure 3 présente un récapitulatif des principaux marqueurs mis en évidence au cours de la cinétique de culture de la chicorée.

Il a aussi été possible de caractériser des marqueurs protéiques (Figure 3). En effet, l'électrophorèse bidimensionnelle a permis de mettre en évidence des protéines dont l'apparition est liée au processus embryogène (Hilbert *et al.*, 1992). Des changements qualitatifs et quantitatifs dans la synthèse des protéines apparaissent durant l'acquisition de la compétence embryogène des tissus foliaires de chicorée. Parmi ces polypeptides, une quinzaine a été détectée spécifiquement durant la phase d'induction. Le rôle de ces protéines n'est pas connu mais le fait qu'elles soient accumulées spécifiquement au cours de la phase d'induction implique qu'elles ont un rôle dans l'acquisition de la compétence embryogène (Boyer *et al.*, 1993).

De plus, dans les milieux de culture de feuilles, trois types de protéines ont été identifiés et associés à l'embryogenèse somatique : 2 β 1-3 glucanases de 38 kDa, 1 chitinase de 30 kDa et 1 protéine de type thaumatine-osmotine de 22 kDa (Helleboid *et al.*, 1998). Si le rôle des deux dernières protéines est encore inconnu, les glucanases seraient impliquées dans le processus de dégradation de la callose qui entoure les cellules engagées dans la voie embryogène. Cette hypothèse est renforcée par le fait que les glucanases disparaissent du milieu si l'on inhibe l'embryogenèse somatique (Helleboid *et al.*, 1995).

Comme chez la carotte, des AGP ont été identifiées et sont impliquées dans le développement des embryons issus de racines de chicorée. L'addition de réactif de Yariv au milieu de culture, qui se lie aux AGP et les précipite, bloque l'embryogenèse somatique, de même que chez la carotte. Au niveau de leur expression, les AGP sont retrouvées durant la transition embryon au stade globulaire embryon au stade torpille (Chapman *et al.*, 2000).

En 1998, Hendriks *et al.* ont mis en évidence l'expression d'un gène codant une

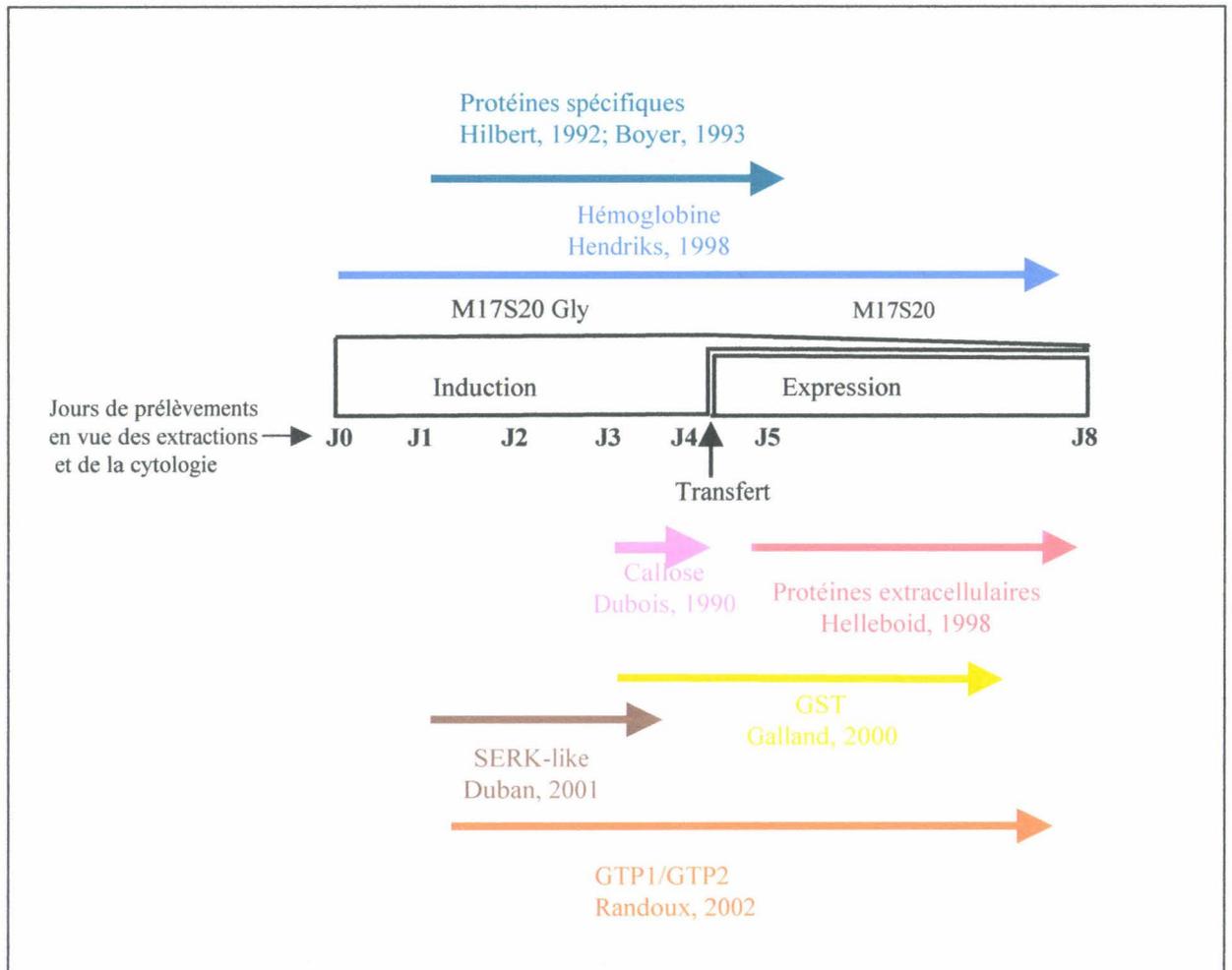


Figure 3: Marqueurs de l'embryogenèse somatique chez la chicorée.

hémoglobine non symbiotique au cours des stades précoces de l'embryogenèse somatique dans les tissus de feuilles de chicorée hybride " 474 " en conditions embryogènes. De plus, ce gène n'est pas exprimé chez un génotype non embryogène dans les mêmes conditions de culture (Hendriks *et al.*, 1998).

L'utilisation de la technique de DD-RT PCR, combinée au criblage d'une banque d'ADNc et à la technique de RACE PCR (Rapid Amplification CDNA Ends) a permis d'isoler 2 ADNc pleine longueur nommés *CHI-GTP1* et *CHI-GTP2* correspondant à 2 gènes ou à deux allèles d'un même gène codant pour des protéines de liaison au GTP de type rab5 (Randoux *et al.*, 2002). Les transcrits du gène *CHI-GTP1* s'accumulent dans les tissus foliaires du génotype embryogène "474" alors qu'ils ne s'accumulent pas dans les tissus foliaires du génotype non embryogène Pévèle cultivé dans les mêmes conditions. Un rôle proposé par les auteurs serait une implication dans le transport vésiculaire et notamment lors des changements de la composition de la paroi. Ces vésicules amèneraient notamment des β 1-3 glucanes et des β 1-4 glucanes nécessaires à la synthèse de callose déposée autour des cellules réactivées en plus de tous les composés nécessaires à l'augmentation de l'épaisseur de la paroi.

En 2001, par la même technique de DD-RT PCR, Galland *et al.* ont identifié un ADNc présentant de fortes homologies avec des protéines de transfert du glutathion : une glutathion S-Transférase (GST), nommé *CHI-GST1*, qui s'accumule dans les tissus embryogènes de "474" à partir du troisième jour de culture jusqu'au septième jour, mais pas chez le génotype non embryogène Pévèle. Des expériences d'hybridation *in situ* et d'immunolocalisation ont permis de localiser les transcrits et les produits du gène *CHI-GST1* dans les tissus foliaires. Les résultats obtenus suggèrent l'existence de plusieurs isoformes de GSTs chez la chicorée dont une serait spécifique des cellules réactivées et des cellules embryonnaires.

2. Fonctionnement du méristème apical et caractérisation de mutants affectés dans la formation et le maintien du méristème

2.1. Le méristème

Chez les plantes à fleurs, le méristème apical racinaire (MAR) donne naissance à l'appareil racinaire tandis que le méristème apical caulinaire (MAC) donne naissance à toute la

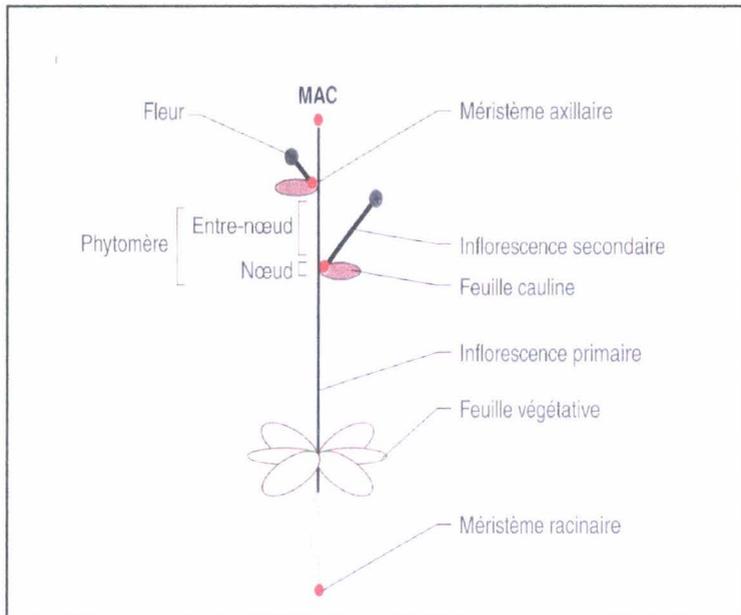


Figure 4 : Représentation schématique de l'architecture *d'Arabidopsis thaliana*
 D'après Autran *et al.*, 2001

Etude bibliographique

partie aérienne de la plante. Le MAC est caractérisé par un développement au cours duquel sont produites des unités séquentielles, appelées phytomères (Figure 4). Un phytomère comporte une feuille, portant éventuellement à son aisselle un méristème axillaire, l'ensemble constituant le nœud, soutenu par une portion de tige appelée l'entre-nœud.

Au cours du développement de la plante, des changements progressifs de l'identité du méristème interviennent. Le méristème apical caulinaire végétatif produit des feuilles. Entre les stade végétatif et floral, le méristème apical végétatif devient un méristème inflorescentiel produisant des feuilles modifiées et des méristèmes floraux latéraux. Ces méristèmes floraux ont une croissance définie puisque leur activité cesse après la production d'un nombre défini d'organes. L'activité des méristèmes aériens détermine la base de l'architecture de la plante. Ainsi, lorsque seul le méristème apical caulinaire est actif, l'architecture générale de la plante est linéaire. Par contre, si des méristèmes axillaires sont activés, des hampes florales secondaires sont formées, donnant naissance à une architecture ramifiée plus complexe.

2.1.1. Formation du méristème

Le zygote d'*Arabidopsis* se divise de façon asymétrique pour donner 2 cellules : une petite cellule apicale à cytoplasme dense et une grande cellule basale à vacuole plus importante. L'embryon dérive de la petite cellule apicale. Au stade globulaire, l'embryon est composé de deux hémisphères. Le méristème apical dérive d'un groupe de cellules de l'hémisphère supérieur de l'embryon globulaire. A la transition entre les stades globulaire et torpille, l'hémisphère supérieur s'organise en trois couches cellulaires. Dès ce moment, le méristème apical est initié à partir de ces trois couches cellulaires. Ces observations suggèrent que le méristème apical soit initié au, ou juste après, le stade torpille de l'embryogenèse.

2.1.2. Organisation des méristèmes

Au sein du MAC, les cellules, qui constituent les unités de base du méristème, ne fonctionnent pas de façon autonome. Elles sont organisées en domaines multicellulaires permettant le fonctionnement du MAC comme un ensemble coordonné (figure 5 a et b). Les méristèmes apicaux des angiospermes et des gymnospermes sont organisés en deux assises cellulaires : une assise externe, la tunica et une assise interne, le corpus. Les cellules de la tunica se divisent de façon anticline alors que le corpus est composé de cellules se divisant de manière péricline. La tunica est composée de deux couches cellulaires L1 et L2 qui

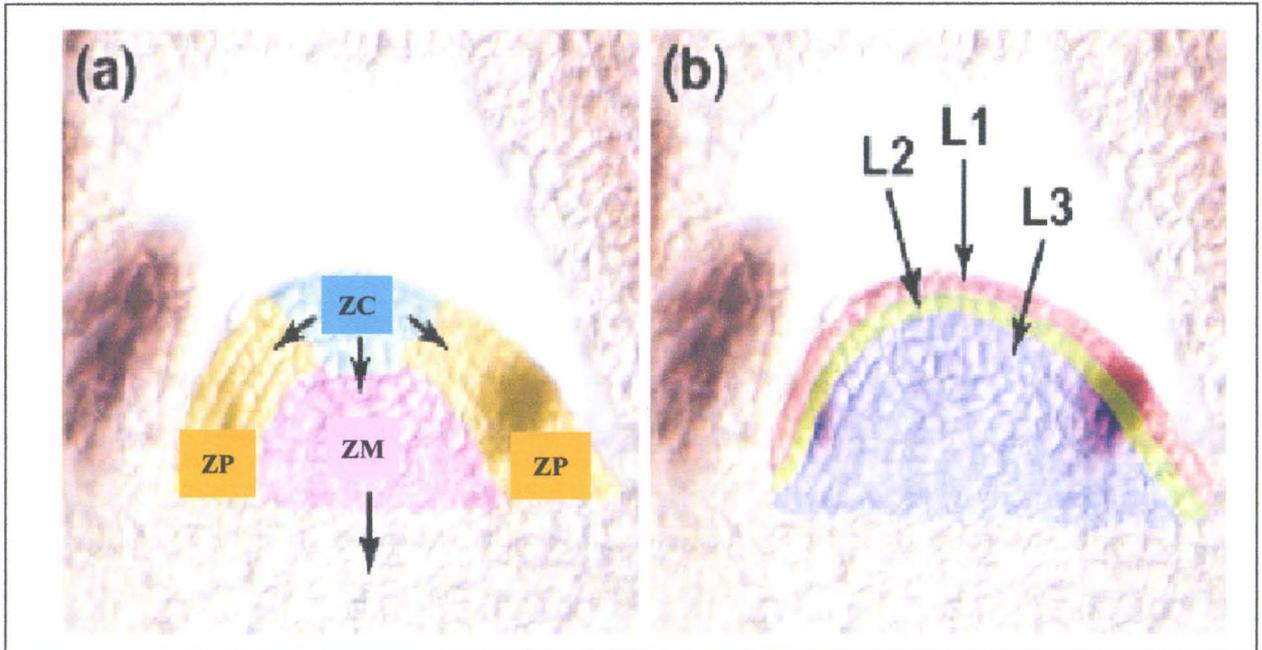


Figure 5 : Organisation des méristèmes en zones (a) et en couches cellulaires (b)
 ZC: Zone Centrale, ZP: Zone Périphérique, ZM: Zone Médullaire
 D'après Bowman *et al.*, 2000

La nomenclature utilisée dans ce manuscrit est conforme à la nomenclature standard utilisée chez *Arabidopsis* (Howell, 1998).

Le nom du gène ou du locus est écrit en lettre majuscule et en italique.

Ex : *WUSCHEL* ou *WUS*

S'il existe plusieurs loci, les loci sont numérotés.

Ex : *CLV1*, *CLV2*, *CLV3*

Le nom de la mutation est écrit en minuscule et en italique.

Ex : *clv1*

Différentes mutations peuvent subvenir dans un gène, et leurs différents allèles mutants sont numérotés séquentiellement

Ex : *clv1-1*, *clv1-2*...

S'il n'existe qu'un seul allèle au locus, l'allèle n'est pas numéroté.

Ex : *clv2*

La protéine est écrite en majuscule et numérotée.

Ex : CLAVATA1 ou CLV1

Encadré 1 : Nomenclature génétique utilisée

Etude bibliographique

entourent le corpus qui forme la couche L3 (Steeves et Sussex, 1989) (Figure 5 b).

A cet arrangement en couches vient se superposer une autre organisation (fig 5 a). Trois zones ont été définies sur la base de critères cytologiques : il s'agit de la zone centrale (ZC), de la zone périphérique (ZP) et de la zone médullaire (ZM). La ZC occupe le centre du méristème et s'étend en profondeur sur une partie de la tunica et du corpus. La ZC est entourée par la ZP d'où partent les primordium. Les cellules de la ZP sont en général plus petites et moins vacuolisées et se divisent plus rapidement. Sous-jacente à la ZC et la ZP, la ZM constitue la base du méristème et est constituée de cellules plus grandes organisées en files qui produisent les parties internes de la tige (Figure 5 a).

Ces études cytologiques montrent que les méristèmes apicaux sont des structures hautement organisées et suggèrent un modèle selon lequel différents gènes clés sont impliqués dans les deux fonctions principales du méristème. En effet, les organes seront mis en place dans la ZP et des cellules indifférenciées (qui seront ensuite orientées vers la formation des organes) vont être maintenues par division dans la ZC (Autran et Traas, 2001).

Le transformation du méristème végétatif en méristème floral s'appelle l'évocation florale. Cette phase correspond aux premières modifications qui se produisent au sein du MAC lors de la floraison. Lors de la transition vers l'état floral, les cellules du méristème se divisent beaucoup plus activement et la zonation du méristème végétatif disparaît.

La suite de cette étude bibliographique va s'articuler en trois parties. La première partie présentera la caractérisation phénotypique des mutants affectés dans le fonctionnement du MAC chez *Arabidopsis thaliana*. La seconde partie détaillera la caractérisation moléculaire des gènes clés exprimés dans le méristème. Enfin, l'expression spatio-temporelle de ces gènes sera abordée dans la troisième partie. La nomenclature utilisée pour décrire gènes, locus, allèles et protéine est présentée dans l'encadré 1.

2.2. Les mutants du MAC : caractérisation, clonage et expression des gènes

Des études génétiques de mutants et la caractérisation moléculaire des gènes ont permis de mieux comprendre le fonctionnement et le maintien de la structure du MAC.

L'intégrité du MAC est possible grâce à un équilibre entre cellules en différenciation et cellules en division. Les gènes *CLAVATA1*, 2 et 3 (*CLV*) chez *Arabidopsis thaliana*

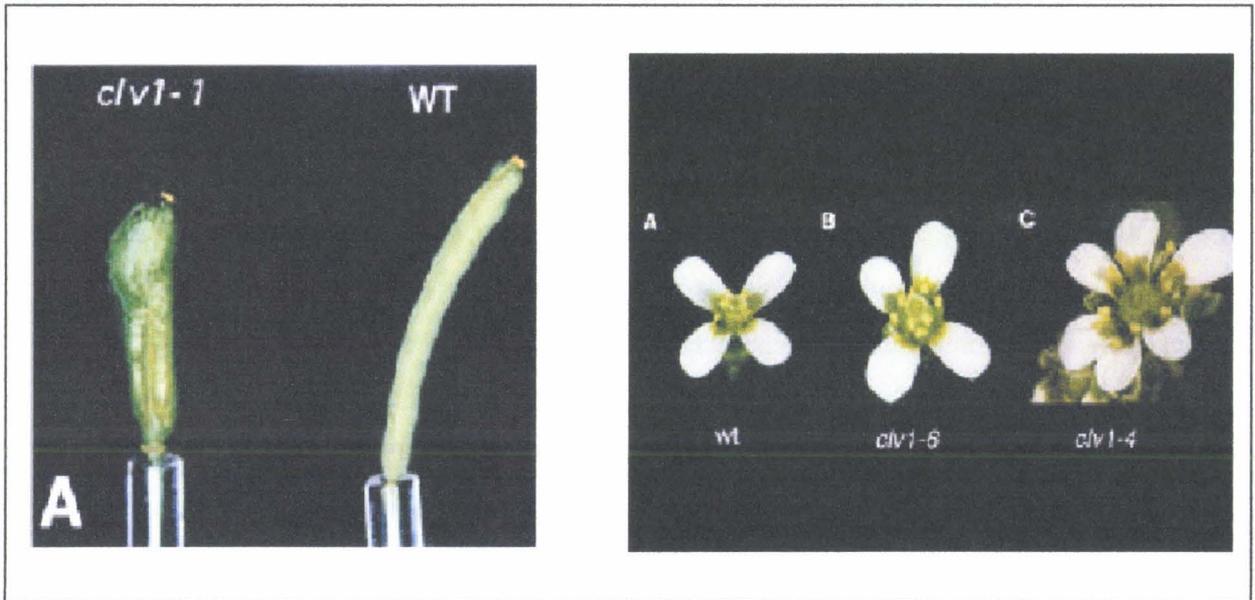


Figure 6 : Effet des mutations *clv1* chez *Arabidopsis*

La silique d'*Arabidopsis thaliana* est modifiée chez le mutant *clv1-1*, en forme de massue par rapport à celle de la plante sauvage WT (A) (clavata en latin signifie massue)

Les fleurs des plantes mutantes peuvent posséder plus d'organes floraux dans les quatre verticilles (B), et même plus de verticilles (C) selon la force de l'allèle mutant.

D'après Clark *et al.*, 1993

Etude bibliographique

apparaissent agir pour limiter la prolifération cellulaire au centre des méristèmes (Clark *et al.*, 1993, 1995). De même, le gène *ZWILLE* (*ZLL*) semble nécessaire pour maintenir la population de cellules indifférenciées au sein du méristème lors de l'initiation des organes (Moussian *et al.*, 1998). *SHOOTMERISTEMLESS* (*STM*) est quant à lui nécessaire à l'initiation du méristème apical embryonnaire chez *Arabidopsis thaliana* (Barton et Poethig, 1993). Un autre gène antagoniste de la régulation par les gènes *CLV* semble le gène *WUSCHEL* (*WUS*) (Laux *et al.*, 1996).

2.2.1. Caractérisation phénotypique des mutants

Mutants *clv1*, *clv2* et *clv3*

En 1993, Clark *et al.* présentent une analyse morphologique et génétique d'une série de mutations dans le locus *CLAVATA1* (*CLV1*) d'*Arabidopsis thaliana*. Les mutations *clv1* ont été induites par l'EMS (Ethyl Methane Sulfonate) et les rayons X. Une mutation *clv1* est apparue spontanément après croisements. Il apparaît que les mutations *clv1* affectent la structure du méristème apical même si les différents allèles *clv1* diffèrent dans leurs effets. L'allèle *clv1-4*, dont l'effet est le plus fort, cause un élargissement plus important du méristème que les autres allèles. Les méristèmes apicaux présentant les mutations *clv1* ont un élargissement de la zone centrale (CZ) du méristème apical.

De plus, *CLV1* intervient dans la structure du méristème floral. En effet, les primordia floraux des mutants *clv1* sont plus grands et développent plus d'organes que les sauvages. *CLV1* est alors le premier locus décrit comme affectant le nombre d'organes sans modifier l'identité des organes floraux (figure 6).

Après avoir décrit le phénotype d'*Arabidopsis thaliana* causé par les mutations *clv1*, Clark en 1995 présente une analyse de la mutation dans le locus *CLAVATA3* (*CLV3*) qui provoque les mêmes symptômes de développement que les mutations *clv1* (Clark *et al.*, 1995).

Les mutations *clv3* ont été obtenues par traitement à l'EMS et par irradiation gamma. La mutation *clv3-2* a pour conséquence une prolifération importante du méristème apical, qui est comparable à l'effet de la mutation *clv1-4*. Dans ce cas, la mutation augmente le nombre de cellules indifférenciées au niveau du méristème apical. Cela impliquerait que le rôle de *CLV3* serait de réguler le « pool » de cellules méristématiques dans le méristème apical. De même, les méristèmes floraux sont élargis chez les mutants *clv3*. La différence fondamentale entre un méristème floral de plante sauvage et un méristème de plante mutante est que le méristème

Etude bibliographique

des mutants ne réussit pas à maintenir les cellules à l'état indifférencié et devient par conséquent une structure déterminée. Ces observations suggèrent que *CLV3* aurait un rôle de restriction de la prolifération méristématique dans le méristème floral de la plante sauvage. Par ailleurs, *CLV3* est un régulateur spécifique du développement des méristèmes floraux et apicaux. En effet, le méristème racinaire n'est pas modifié par la mutation *clv3*.

Les deux gènes *CLV1* et *CLV3* sont actifs dans la même voie de signalisation et sont fondamentaux pour maintenir le nombre de cellules dans les différentes zones du méristème.

Les mutants *clv2* ont été isolés et partiellement caractérisés par Koornneef *et al.* (1983). Kayes a ensuite réalisé une étude génétique de ces mutants pour comprendre le rôle de *CLAVATA2 (CLV2)* dans le développement du méristème.

Au niveau du MAC, l'effet phénotypique des mutations *clv2* est comparable à celui observé chez des mutants *clv1* et *clv3* à effet faible, et se traduit par un élargissement de la zone centrale du MAC.

Dans les méristèmes floraux de ces mutants, on observe des modifications de la structure des organes floraux plus accentuées que chez les mutants *clv1* et *clv3*, par exemple des étamines de taille réduite et un allongement du pédoncule floral.

Comme *CLV1* et *CLV3*, *CLV2* est nécessaire pour empêcher l'accumulation de cellules indifférenciées aux niveaux des méristèmes.

Mutant *stm*

En 1993, Barton *et al* ont décrit l'initiation du méristème apical chez des embryons sauvages d'*Arabidopsis thaliana* et l'effet d'une mutation récessive dans le gène *SHOOTMERISTEMLESS (STM)*. Les mutations ont été obtenues par traitement des graines à l'EMS. Les études ont été effectuées sur les descendants des plantes issues de graines mutées.

Des études histologiques de coupes d'embryons aux stades globulaire, cœur, torpille et cotylédonaire ont été réalisées afin d'identifier à quel stade du développement les premiers effets de la mutation sont visibles. Jusqu'au stade torpille, l'organisation du méristème embryonnaire des mutants *stm-1* est identique à celle d'une plante sauvage, suggérant que la mutation *stm-1* engendre un blocage du développement du méristème apical, à ou juste après, le stade torpille de l'embryogenèse. Ce blocage pourrait être dû à l'incapacité des cellules précurseurs du méristème apical à se diviser. Il faut noter que la mutation *stm-1* empêche la

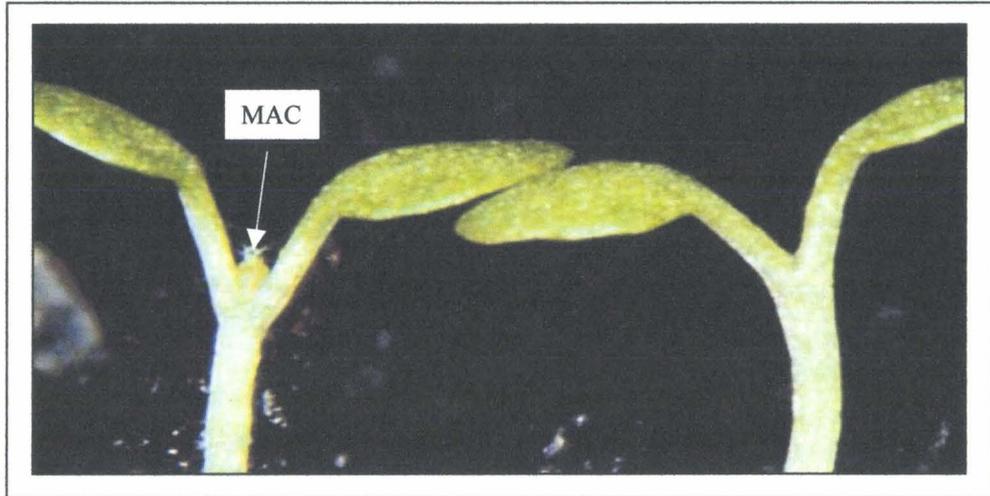


Figure 7 : Effet de la mutation *stm-1* chez *Arabidopsis*: à droite mutant *stm-1*, à gauche plante sauvage.
 Les mutants *stm-1* ne possèdent pas de méristème apical, mais sont normaux par ailleurs
 D'après Barton *et al.*, 1993

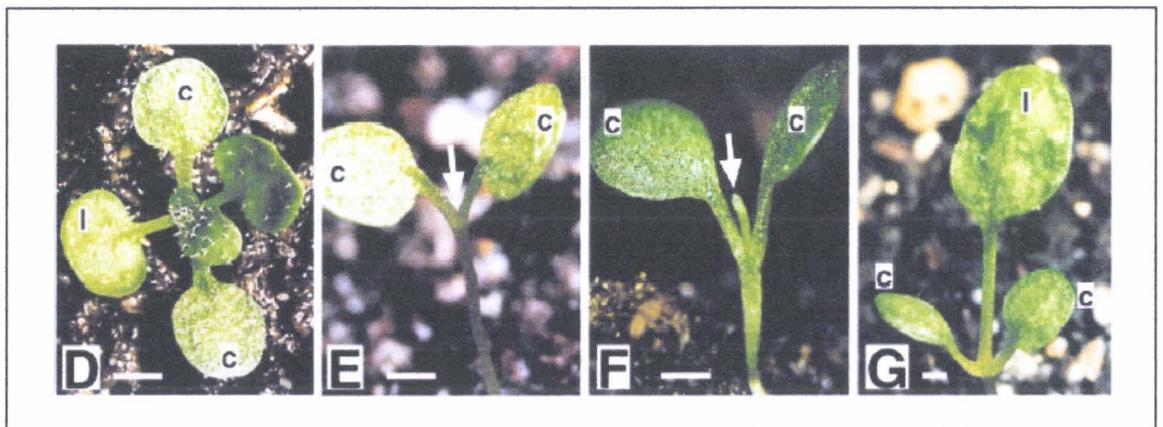


Figure 8: Effet des mutations *zwille* chez *Arabidopsis*.
 Après la germination, le méristème apical des plantes sauvages initie une rosette de feuilles (D).
 Les plantules mutantes n'ont pas de méristème apical (E), ou présentent une structure filamenteuse
 au niveau de l'apex (F) ou développent une feuille unique (G)
 D'après Moussian *et al.*, 1998

Etude bibliographique

formation du méristème apical embryonnaire sans affecter la capacité de l'embryon à produire des structures telles que des cotylédons.

Au cours du développement post embryonnaire, les mutants *stm-1* homozygotes ne possèdent pas de méristème apical, mais sont normaux par ailleurs (Figure 7). Des différences phénotypiques peuvent être identifiées 4 jours après la germination entre plantes mutantes et sauvages: les premières feuilles initiées normalement sont absentes chez les mutants. De même, les plantes mutantes ne possèdent pas de fleur.

Un autre allèle mutant à effet fort sur le phénotype (*stm-5*) a été caractérisé par Clark *et al.* (1996). Les embryons *stm-5* ne possèdent pas de méristème apical différencié. Les plantules présentent des cotylédons et des feuilles fusionnées, les inflorescences avortent en fleurs uniques et ces fleurs possèdent des étamines fusionnées. Seules des feuilles post embryonnaires enfermées dans les cotylédons fusionnées semblent être initiées. Leur origine serait des cellules apicales précurseurs situées à la même position que le méristème apical présent chez la plante sauvage. *STM* semble nécessaire à l'initiation du MAC.

En 1996, Clark *et al.* caractérisent l'effet de la mutations *stm-2* dont l'effet est plus faible que celui des mutations *stm-1* et *stm-5*. Les embryons *stm-2* présentent quelques cellules denses au niveau de l'intersection des cotylédons (à la place du méristème). Après 16 jours, toutes les plantules présentent des feuilles. Cependant, la mutation *stm-2* affecte la structure du méristème floral qui permet la mise en place d'inflorescences à fleurs défectueuses.

Mutants *zll*

Les embryons mutants *zwillle* (*zll*) d'*Arabidopsis thaliana* présentent un méristème apical embryonnaire mal organisé (Jürgens *et al.*, 1994).

En 1998, Moussian *et al.* ont précisé le rôle du gène *ZWILLE* pendant l'embryogenèse et lors du développement post embryonnaire (Moussian *et al.*, 1998). Lors des stades précoces de l'embryogenèse et jusqu'au stade torpille, il n'y a pas de différence de développement entre les embryons *zll* et les embryons sauvages. Par contre dans les embryons matures *zll*, on ne détecte pas de cellule méristématique caractéristique du méristème en formation. En effet, les cellules de l'apex sont plus grandes et plus vacuolisées suggérant que ces cellules ont initié leur différenciation. L'organisation en zones centrale/périphérique du méristème est perturbée chez les mutants. Un des modes d'action de *ZLL* semble être d'empêcher la différenciation cellulaire dans le centre de l'apex embryonnaire.

Après la germination, le méristème apical des plantes sauvages initie une rosette de

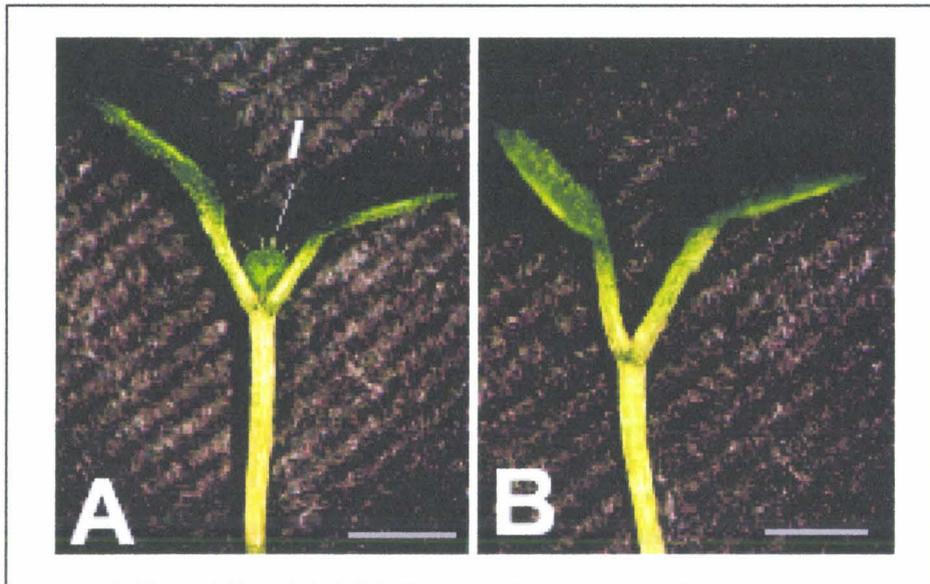


Figure 9: Effet de la mutation *wus-1* chez *Arabidopsis*
Les jeunes feuilles (l) sont visibles chez le sauvage (A) et pas chez le mutant (B).
D'après Laux *et al.*, 1996

Etude bibliographique

feuilles (Figure 8 D). Les mutations *zll* n'empêchent pas le déroulement normal de la germination. Cependant, selon la force de l'allèle mutant, les plantules n'ont pas de méristème apical (Figure 8 E), ou présentent une structure filamenteuse au niveau de l'apex (Figure 8 F) ou développent une feuille unique (Figure 8 G) (Jürgens *et al.* en 1994).

Chez les mutants *zll* incapables de développer un méristème apical, on observe cependant la formation *de novo* de méristèmes adventifs apicaux (MAA) à la base des pétioles cotylédonnaires. Ces MAA initient des feuilles en périphérie mais plus larges et plus longues que celles observées chez les sauvages. Il en résulte un phénotype fascié de ces plantes. *ZLL* n'est donc pas indispensable à la formation de méristèmes adventifs.

Par ailleurs, le développement des cotylédons, des phytomères, et du méristème racinaire n'est pas modifié chez les plantules *zll*, suggérant que la fonction *ZLL* n'est nécessaire dans l'embryon que pour la mise en place du méristème apical (Moussian *et al.*, 1998).

Mutant *wus*

En 1996, Laux *et al.* ont identifié le gène *WUSCHEL* (*WUS*) dont la mutation perturbe le développement des méristèmes apicaux végétatifs et floraux chez *Arabidopsis*.

Les travaux ont porté sur l'étude approfondie des mutants *wus-1* (Figure 9). Dans les embryons *wus-1*, il n'y a pas de méristème reconnaissable à aucun des stades embryonnaires. Cependant, la présence de cellules plus grandes et plus vacuolisées à la place du méristème indique que l'initiation du méristème s'est réalisée mais que l'organisation est défectueuse.

Dix jours après la germination, le MAC n'est pas mis en place. Seul un apex mou sans organisation zone centrale/zone périphérique est visible. Cependant, des méristèmes apicaux secondaires capables de produire des rosettes de feuilles sont initiés à partir de la région centrale de l'apex ou de l'axe des feuilles. Cette mise en place de structures différenciées indique que les défauts de développement sont moins prononcés au cours du développement post embryonnaire.

Les fleurs *wus-1* ne présentent pas les deux verticilles centraux d'organes et se terminent par une étamine centrale.

Interactions génétiques entre les différents gènes

En étudiant l'effet de doubles mutations, il a été possible de proposer un modèle d'interaction entre les différents gènes. Si les gènes fonctionnent dans une voie différente de

Etude bibliographique

régulation d'un processus unique, alors les doubles mutants ont des phénotypes différents ou encore plus prononcés que ceux des mutants simples ayant les effets les plus forts. Si les gènes fonctionnent dans la même voie, les doubles mutants ont des phénotypes identiques ou proches de ceux des mutants simples ayant les effets les plus forts.

Les mutants *clv1*, *clv3* et dans une moindre mesure *clv2* présentent globalement les mêmes phénotypes à savoir principalement un élargissement du méristème. Dans ces conditions, une hypothèse probable est que ces gènes interviennent dans la même voie de signalisation. Pour confirmer cette hypothèse, plusieurs expériences de constructions de doubles mutants et d'étude de leur phénotype ont été réalisées.

Différents doubles mutants *clv1/clv3* (Clark *et al.*, 1995) ont été construits en utilisant différents allèles de mutants simples *clv1* et *clv3*. Le phénotype de ces doubles mutants est similaire à celui des mutants simples homozygotes pour les allèles dont les effets sont les plus forts. Ceci indique que les produits des gènes *CLV1* et *CLV3* interviennent dans un processus commun de régulation.

De même, différents double mutants *clv1/clv2* et *clv2/clv3* (Kayes *et al.*, 1998) ont été comparés phénotypiquement aux mutants simples. Les résultats au niveau du MAC sont identiques à ceux obtenus pour les doubles mutants *clv1/clv3* à savoir un élargissement du méristème. De même, le nombre d'organes des fleurs des doubles mutants *clv2/clv3* est similaire à celui des mutants simples à effet fort. Par contre, on observe une additivité de l'effet des mutations *clv2+clv1* ou *clv2+clv3* chez les doubles mutants pour ce qui est du développement des organes floraux. En effet, ces doubles mutants présentent des anomalies de formation du gynécée plus prononcées que les mutants simples.

Ces résultats suggèrent alors que *CLV2* fonctionne dans la même voie de régulation de développement des MAC et des méristèmes floraux que *CLV1* et *CLV3* alors qu'il apparaît intervenir dans une voie séparée pour ce qui est de la régulation de développement des organes floraux.

En 1996, Clark *et al.*, ont décrit l'interaction entre les gènes *CLV1*, 2 et 3 et *STM* au cours du développement du méristème chez *Arabidopsis thaliana*. Chez des doubles mutants *clv/stm*, les mutations *clv* stimulent la vitesse, la fréquence et le développement d'un MAC post-embryonnaire chez les plantes *stm-1* et *stm-2*, mais ne restaurent pas la formation du MAC embryonnaire. Chez certains doubles mutants, au niveau du dôme apical, on observe

Etude bibliographique

clairement des cellules à cytoplasme dense indiquant qu'une activité méristématique a commencé.

L'activité méristématique florale est aussi partiellement restaurée par les mutations *clv* chez les mutants *stm*. En effet, des fleurs modifiées sont observées chez les mutants *clv/stm-1* alors que le mutant simple *stm1* est incapable de produire des fleurs. Des fleurs parfois fertiles sont obtenues chez les mutants *clv/stm-2*, le mutant *stm2* simple produisant dans de rares cas des carpelles.

Il existe ainsi des interactions génétiques entre ces gènes. *CLV* et *STM* semblent jouer des rôles antagonistes dans le développement des méristèmes apicaux et floraux : les gènes *CLAVATA* interviendraient dans la ZP du méristème en limitant la prolifération cellulaire, *STM* serait actif dans la ZC empêchant la différenciation cellulaire.

La relation entre *STM* et *WUS* a ensuite été étudiée par l'observation de doubles mutants *stm/wus* (Endrizzi et al., 1996). Les analyses ont été réalisées avec le mutant à effet allèle faible *stm-2*. Chez les doubles mutants, on observe un phénotype similaire à celui des mutants *stm* homozygotes pour l'allèle dont l'effet est le plus fort (*stm-5*), la mutation *wus* augmente ainsi l'effet de la mutation *stm-2*. La fonction partielle *STM* présente chez le mutant *stm-2* nécessite alors l'activité *WUS* pour maintenir un phénotype peu altéré comme celui des mutations à effet faible.

De même, Lenhard *et al.* en 2002 ont cherché à comprendre comment les fonctions de *WUS* et de *STM* sont intégrées dans la régulation du méristème apical caulinaire et ont pour cela analysé leur interaction, en utilisant des approches gain et perte de fonctions.

Sachant que le gène *ANT* (ANTegumenta) est exprimé spécifiquement dans les primordia d'organes, des constructions permettant l'expression de *WUS* et *STM* sous contrôle du promoteur *ANT* ont été réalisées. *STM* et *WUS* fonctionnent dans des voies séparées au sein du méristème. En effet, leur expression ectopique (c'est à dire en dehors de leur territoire d'expression) au sein du méristème n'a pas le même effet. Exprimé de façon ectopique, *WUS* est suffisant pour empêcher l'initiation des organes alors que *STM* permet d'initier le développement des organes mais la différenciation cellulaire est supprimée, les cellules continuent à proliférer. Les gènes cibles induits par l'expression ectopique de *WUS* et *STM* sont aussi différents. *WUS* induit l'expression de *CLV3* (marqueur de cellule souche) dans les organes différenciés alors que l'expression ectopique de *STM* induit l'expression de *KNAT 1* ou *KNAT2* qui sont deux gènes homéotiques qui ont des fonctions potentielles de régulation

Etude bibliographique

dans le méristème apical (Lincoln *et al.*, 1994; Dockx *et al.*, 1995; Chuck *et al.*, 1996; Pautot *et al.*, 2001).

De plus, les phénotypes gain de fonction associés à l'expression de *WUS* ne nécessitent pas l'activité du gène *STM* et réciproquement, indiquant qu'ils fonctionnent dans des voies génétiques différentes. De même, les perturbations au sein du méristème causées par les mutations perte de fonction *wus* et *stm* ne peuvent pas être restaurées par l'expression transgénique de l'autre gène. Ainsi ces gènes remplissent des fonctions distinctes mais complémentaires dans la régulation du MAC. La fonction *WUS* contrôle un groupe de cellules au centre du méristème en les maintenant comme cellules souches alors que *STM* est nécessaire pour empêcher la différenciation cellulaire au niveau du dôme méristématique.

De même, la relation entre *STM* et *ZLL* a été étudiée (Endrizzi *et al.*, 1996). L'effet de la double mutation est différent suivant le mutant *stm* (*stm-2* ou *stm-5*). Les plantes *zll/stm-5* ne montrent pas de phénotype différent de celui des plantes *stm-5*. L'effet de l'allèle *stm-5* apparaît donc épistatique sur celui de la mutation *zll*. Par contre, les embryons *zll/stm-2* sont plus sévèrement désorganisés que les deux mutants simples alors que le développement post embryonnaire n'est pas affecté par la mutation *zll*, suggérant que l'activité partielle *STM* de l'allèle *stm-2* fonctionne en parallèle à *ZLL*.

De la même manière, les interactions entre *WUS* et *ZLL* ont été étudiées (Endrizzi *et al.*, 1996). Chez les doubles mutants *wus/zll*, le développement est identique à celui des mutants simples pendant deux semaines après la germination. Ensuite, les doubles mutants ressemblent aux mutants *wus* pour lequel le MAC est transformé en un apex mou et possèdent des fleurs sans organes floraux centraux. L'effet de la mutation *wus* semble épistatique sur celui de la mutation *zll*.

En résumé, les fonctions *WUS* et *ZLL* sont nécessaires au maintien d'un MAC fonctionnel uniquement chez les mutants *stm* à phénotypes intermédiaires et faibles, pour lesquels le MAC n'est pas précocement altéré. Quand la fonction *STM* est totalement absente (dans le cas d'une mutation perte de fonction), les fonctions *WUS* et *ZLL* sont inutiles. En effet, *STM* agirait en amont de *ZLL* et *WUS* pour maintenir un pool de cellules indifférenciées dans le méristème, *WUS* et *ZLL* seraient nécessaires pour le développement du MAC.

Etude bibliographique

En 2000, les interactions entre les gènes *CLV* et *WUS* ont été étudiées (Schoof *et al.*, 2000). Les apex des embryons *wus/clv1* et *wus/clv3* sont mous, peu marqués, identiques à ceux des mutants simples *wus*. De même, au cours du développement embryonnaire, les MAC des doubles mutants sont identiques à ceux des mutants simples *wus*, transformés rapidement en un apex mou après avoir initié trois ou quatre fleurs. Une minorité d'inflorescences *wus/clv1* ou *wus /clv3* produit plus de 10 fleurs. Au cours du développement floral, le méristème des mutants *wus/clv1* ou *wus/clv2* se transforme en une étamine centrale comme chez le mutant *wus*, donnant des phénotypes opposés à ceux des mutants simples *clv*. Une interprétation de ces résultats est que les gènes *CLV* régulent négativement *WUS* mais ont des fonctions supplémentaires indépendantes de *WUS* du fait du nombre plus grand de fleurs obtenues chez les doubles mutants par rapport aux mutants simples *wus*.

2.2.2. Clonage et caractérisation moléculaire des gènes

Le gène *CLV1* a été isolé par clonage positionnel et la séquence protéique déduite de ce gène montre qu'il appartient à la famille des récepteurs à activité kinase (Clark *et al.*, 1997). En effet, le domaine extracellulaire présumé est composé de 21 LRR (Leucine Rich Repeat) et le domaine intracellulaire contient tous les résidus conservés dans les récepteurs à activité sérine/thréonine kinase connus chez les plantes. Les domaines extracellulaires et intracellulaires sont séparés par un domaine trans-membranaire précédé d'une région riche en cystéine qui est caractéristique de ce type de protéine.

D'autres études ont précisé la nature moléculaire de *CLV3* (Fletcher *et al.*, 1999). La comparaison de la séquence génomique et de la séquence de l'ADNc a révélé la présence de trois exons et de deux petits introns. Le gène *CLV3* code une protéine de 96 acides aminés qui ne montre aucune similarité avec d'autres séquences connues. Une région de 18 acides aminés hydrophobes du côté NH₂ terminal correspondrait à un peptide signal permettant l'excrétion de la protéine, indiquant que *CLV3* pourrait être une protéine extra-cellulaire et pourrait agir comme un ligand de *CLV1*. *CLV3* pourrait aussi être le ligand, ou fonctionner comme un co-ligand avec une autre petite molécule ou assister la liaison du ligand à *CLV1*.

De même que pour *CLV3*, la caractérisation moléculaire de *CLV2* a été entreprise (Jeong *et al.*, 1999). Le gène *CLV2* ne possède qu'un seul exon qui code une protéine de 720

acides aminés. La majorité de la protéine consiste en des LRR et montre des similarités avec le domaine extracellulaire de récepteurs de kinase connus chez les plantes et les animaux .

Long *et al.* en 1996 ont caractérisé le gène *STM* d'*Arabidopsis thaliana* au niveau moléculaire. La protéine STM possède 382 acides aminés. *STM* est un gène de la classe I des "KNOTTED-like", ceci étant basé sur les similarités importantes de séquences dans l'homéodomaine aussi bien que sur le profil d'expression chez la plante. Trois blocs de séquences conservées sont trouvés en amont de l'homéodomaine : deux entre la région 181 à 220 pour former une hélice amphipatique qui joue un rôle dans l'interaction protéine-protéine et un troisième : le domaine ELK qui jouerait un rôle de domaine d'activation transcriptionnelle.

Le clonage positionnel du gène *ZLL* a été réalisé en 1998 (Moussian *et al.*, 1998). Un cadre de lecture de 2964 nucléotides a été obtenu. Le gène *ZLL* code une protéine de 998 acides aminés, de nature hydrophile, suggérant qu'elle est soluble dans le cytoplasme. La région NH₂ terminale (résidus 1 à 123) est riche en proline. Du résidu 124 à 988, la protéine présentent 75% d'identité avec la protéine ARGONAUTE1. *ZLL* est membre d'un nouveau groupe de séquences très conservées entre le règne animal et le règne végétal.

L'identification du gène *WUS* a été réalisée par clonage positionnel. Le gène *WUS* possède deux introns et code une protéine de 291 acides aminés à deux domaines fonctionnels. La région entre les acides aminés 33 et 98 montre des similarités avec des homéodomaines et la région entre les acides aminés 234 et 241 contient un groupe de résidus acides qui peut former une hélice alpha amphipatique similaire au domaine de transactivation des régulateurs de transcription. *WUS* représente un nouveau type de la famille des protéines à homéodomaine qui sont souvent impliquées dans les processus de régulation (Mayer *et al.*, 1998).

2.2.3. Caractérisation de l'expression spatio-temporelle des gènes

L'expression de *CLVI* a été étudiée chez *Arabidopsis thaliana* par Clark *et al.* (1997). Chez les plantes sauvages, les transcrits *CLVI* sont exprimés dans les méristèmes floraux et apicaux. Dans l'embryon, les transcrits *CLVI* sont retrouvés dans le méristème apical présumé. Pendant le développement post embryonnaire, *CLVI* est exprimé dans le MAC

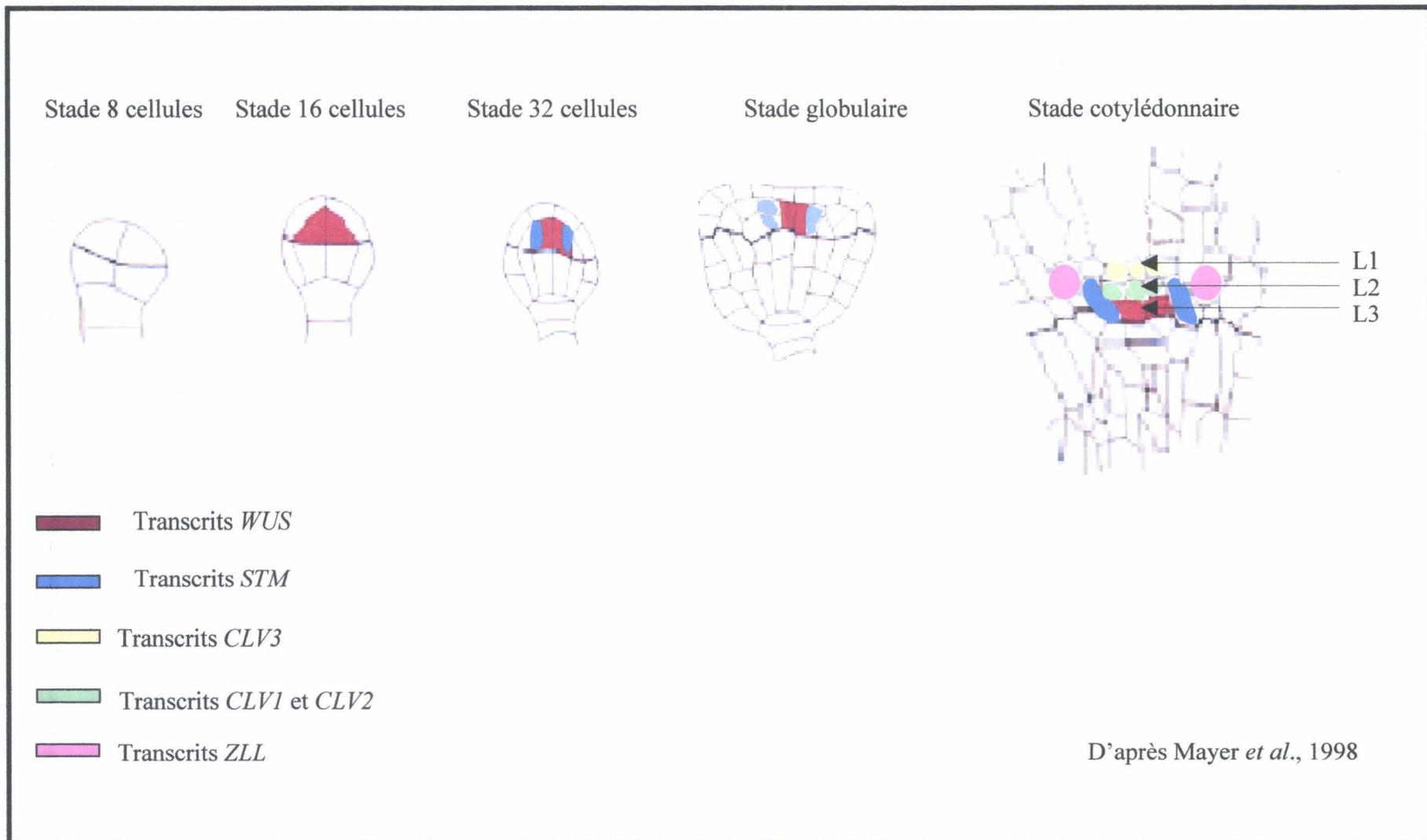


Figure 10: Evolution de l'expression des transcrits en fonction du stade de développement de l'embryon zygotique

Etude bibliographique

dans une région comprenant un ensemble de cellules centrales. Les transcrits ne sont pas détectés dans le méristème racinaire. Dans les méristèmes floraux, l'expression de *CLV1* suit l'initiation des organes floraux. Au stade floral 1 (selon Smyth *et al.*, 1990), il n'y a pas d'expression *CLV1*. Du stade 2 au stade 5, les transcrits sont détectés au centre du méristème puis ne sont plus détectés. Comme dans les MAC, les transcrits ne sont pas détectés dans la couche L1.

De même pour *CLV2*, les transcrits sont retrouvés dans de nombreux tissus. Par northern blot, un signal est détecté dans tous les tissus de la plante avec l'expression la plus forte dans les MAC et les fleurs non ouvertes (Jeong *et al.*, 1999). Dans le MAC, le domaine d'expression de *CLV2* recouvre celui de *CLV1* (figure 10).

Le profil d'expression de *CLV3* pendant le développement d'une plante sauvage a aussi été analysé (Fletcher *et al.*, 1999). Les premiers transcrits *CLV3* sont détectés au stade cœur de l'embryon, entre les cotylédons en développement (figure 10). Dans les méristèmes végétatifs et inflorescentiels, les transcrits *CLV3* s'accumulent dans une petite zone de l'apex du méristème. Ils sont retrouvés dans les couches L1 et L2 et un peu dans la couche L3 mais ne sont pas détectés dans les cellules initiant les primordia de feuilles et de fleurs. Les transcrits réapparaissent au stade floral 2 (selon Smyth *et al.*, 1990) dans le méristème floral et persistent au centre du méristème floral jusqu'au stade 6.

Les profils d'expression de *CLV1* et *CLV3* sont très similaires même si les transcrits *CLV1* ne sont pas détectés dans la couche L1 mais dans la couche L3.

Pour étudier le profil d'expression de *STM*, des hybridations *in situ* ont été réalisées chez les plantes sauvages d'*Arabidopsis thaliana* (Long *et al.*, 1996).

Dans l'embryon zygotique, les transcrits apparaissent avant l'initiation du méristème apical et s'accumulent dans les cellules initiales du méristème, à partir du stade globulaire moyen dans une ou deux cellules. On peut noter la relation entre les cellules qui accumulent des transcrits *STM* et les cellules prédestinées à donner naissance au méristème apical. Dans l'embryon globulaire tardif, les transcrits *STM* sont détectés dans une bande traversant la moitié supérieure de l'embryon. Au stade cœur, torpille et embryon mature, l'expression est restreinte à la base des cotylédons.

L'expression du gène *STM* persiste dans la plante où il est présent dans quatre types de

Etude bibliographique

méristèmes : végétatif, axillaire, inflorescentiel et floral. Dans les tissus végétatifs, les transcrits *STM* sont accumulés dans les MAC mais pas dans les primordia foliaires, suggérant que l'expression de *STM* est restreinte aux cellules centrales du méristème (figure 10). Les transcrits s'accumulent aussi dans la tige au niveau des cordons vasculaires. Dans les inflorescences, l'expression de *STM* disparaît au moment où les boutons floraux sont initiés et réapparaît quand les organes floraux sont initiés.

Ce profil d'expression embryonnaire et végétatif est très similaire à celui de *KNOTTED1(KNI)* chez le maïs. De plus, le rôle de *KNI* qui serait de garder les cellules dans un état indifférencié, ce qui est identique au rôle proposé pour *STM* dans le maintien du méristème apical. Ceci suggère alors que ces deux gènes sont orthologues.

Dans l'embryon, l'expression de *ZLL* est restreinte à un petit groupe de cellules probablement au niveau du pôle de phloème. De plus, les ARNm sont détectés dans les apex de façon plus tardive au cours de l'embryogenèse. Lors du développement post embryonnaire, les transcrits *ZLL* sont retrouvés dans les cellules provasculaires à tous les stades de développement (Figure 10), l'expression de *ZLL* présage donc l'initiation d'organes dans les cellules provasculaires (Moussian *et al.* 1998).

Pour préciser l'interaction entre *ZLL* et *STM*, une analyse du profil d'expression de *STM* comme marqueur moléculaire a été réalisée dans les embryons *zll*. Pendant les phases précoces, l'expression de *STM* n'est pas modifiée chez le mutant *zll*, suggérant que le programme est initié correctement. Au cours des phase tardives, l'expression de *STM* est fortement modifiée. En effet, les transcrits *STM* sont confinés dans les cellules latérales du méristème. *ZLL* régule donc le profil d'expression de *STM* au cours de l'embryogenèse tardive.

La localisation cellulaire de *WUS* a été réalisée grâce à la mesure de l'activité GUS chez des plantes transformées exprimant le gène *GUS* sous le contrôle du promoteur du gène *WUS*. La localisation cellulaire de *WUS* dans le noyau est en accord avec son rôle dans la régulation de transcription (Mayer *et al.*, 1998).

Comme il a été cité précédemment, *WUS* est nécessaire au maintien des cellules méristématiques dans la ZC. Ainsi, l'accumulation des ARN messagers de *WUS* a été suivie pendant l'embryogenèse. Au stade 8 cellules, aucune expression *WUS* n'est détectée. Au stade 16 cellules, *WUS* est exprimé dans les cellules centrales et est absent dans les cellules

Etude bibliographique

périphériques. Au stade 100 cellules, il est exprimé dans 2 cellules subépidermales au centre de l'apex. Au stade cœur, ce dernier est retrouvé dans la couche L3 du méristème (Figure10).

Pendant le développement post embryonnaire, l'expression de *WUS* a été étudiée dans les méristèmes apicaux et floraux. Les transcrits restent confinés à un groupe de cellules au centre du méristème apical sous les trois couches cellulaires les plus externes L1, L2 et L3. Pendant le développement de l'inflorescence, le niveau d'accumulation des transcrits est le plus fort au stade floral 2 (selon Bowman, 1994). Les transcrits sont accumulés dans un petit groupe de cellules centrales appartenant à la couche L3. Quand les primordia carpellaires émergent, le signal diminue jusqu'à devenir indétectable.

Pour confirmer la régulation négative de *WUS* par les gènes *CLV* au niveau transcriptionnel, des analyses de l'expression de *WUS* chez des mutants *clv* ont été réalisées par hybridation *in situ* (Schoof *et al.*, 2000).

Chez les plantes sauvages, *WUS* est exprimé dans 4 cellules apicales de l'embryon au stade 16 cellules et est confiné au sein du méristème apical. Au stade cœur, 2 cellules subépidermiques expriment *WUS*. Les deuxième et troisième couches ne montrent jamais son expression. Plus tardivement, au sein du méristème, il est exprimé dans un petit groupe de cellules au centre du méristème chez le sauvage.

Chez les mutants *clv*, *WUS* est exprimé dans une couche de cellules plus apicale que chez le sauvage. En général, le domaine d'expression de *WUS* est plus grand chez les mutants *clv* que chez les plantes sauvages.

Dans les méristèmes floraux des plantes sauvages, *WUS* est exprimé aux stades précoces dans quelques cellules du centre du méristème. Chez les mutants *clv1* et *clv3*, *WUS* a un domaine d'expression plus étendu, chez les mutants *clv2*, il n'y a pas de différence. De même, chez le sauvage, à la fin du développement floral, *WUS* n'est plus exprimé. Chez les mutants *clv1*, *clv2* et *clv3*, il continue à être exprimé.

Les trois gènes *CLV* sont donc nécessaires pour supprimer l'expression de *WUS* dans les couches cellulaires apicales du MAC et limiter son expression latérale. *CLV1* et *CLV3* sont nécessaires et suffisants pour restreindre le domaine d'expression de *WUS* aux cellules centrales du méristème floral et les trois gènes *CLV* sont nécessaires pour supprimer l'expression de *WUS* à la fin du développement floral.

En exprimant *WUS* sous contrôle du promoteur *CLV1*, les plantules transformées montrent toutes des méristèmes apicaux plus grands, ce qui est très similaire au phénotype

Etude bibliographique

provoqué par les mutations *clv*. Les fleurs, si elles sont présentes, possèdent des organes surnuméraires. Les plantes transformées exprimant une version mutée du gène *WUS* sont de phénotype sauvage, ceci indique que les modifications observées sont causées par la protéine *WUS*. L'expression de *WUS* dans un domaine plus grand provoque un phénotype très similaire à celui des mutants *clv*. Le phénotype *clv* observé chez ces transformants est dû à la dérégulation de l'expression de *WUS*.

La dernière question était de savoir si *WUS* est suffisant pour induire l'identité cellulaire. Des constructions permettant l'expression de *WUS* sous contrôle du promoteur *ANT* ont été réalisées (expression spécifique dans les primordia d'organes). Après activation du transgène, la formation de feuille est inhibée et un massif de cellules est formé à la place des feuilles. Les plantes transgéniques expriment *CLV3* dans les trois couches L1 L2 et L3. Ces résultats indiquent que *WUS* est suffisant pour induire l'expression de *CLV3* dans son domaine d'expression et induire l'identité cellulaire de cellules indifférenciées. De plus, la fonction *WUS* doit être éteinte pour permettre l'initiation des primordia d'organes.

Ces résultats suggèrent un modèle dans lequel la taille de la population de cellules initiales du méristème est maintenue par un équilibre entre les cellules apicales et les cellules centrales sous le contrôle des activités des gènes *WUS* et *CLV*.

Ces résultats ont été confirmés et complétés par Brand *et al.* en 2000 qui ont utilisé des plantes d'*Arabidopsis thaliana* surexprimant *CLV3* pour expliquer la voie de régulation des gènes *CLV*. Dans la majorité des cas, chez les plantes surexprimant *CLV3*, les méristèmes apicaux cessent d'initier des organes après l'émergence des premières feuilles. Dans quelques cas correspondant aux plantes qui expriment faiblement le transgène, les plantes forment des méristèmes inflorescentiels qui ne produisent pas de verticilles de carpelles et d'étamines dans les fleurs. Ces résultats impliquent que le devenir des cellules au sein du méristème est du moins en partie sous le contrôle du niveau d'expression de *CLV3*.

De plus, la surexpression de *CLV3* chez des mutants *clv1* ou *clv2* ne modifie pas le phénotype du mutant. Ainsi, l'action de *CLV3* nécessite que *CLV1* et *CLV2* soient fonctionnels.

Chez les plantes surexprimant *CLV3*, aucune expression des transcrits *WUS* n'est détectée, suggérant que l'activation de la voie de signalisation *CLV* induit une sévère réduction de la transcription de *WUS*.

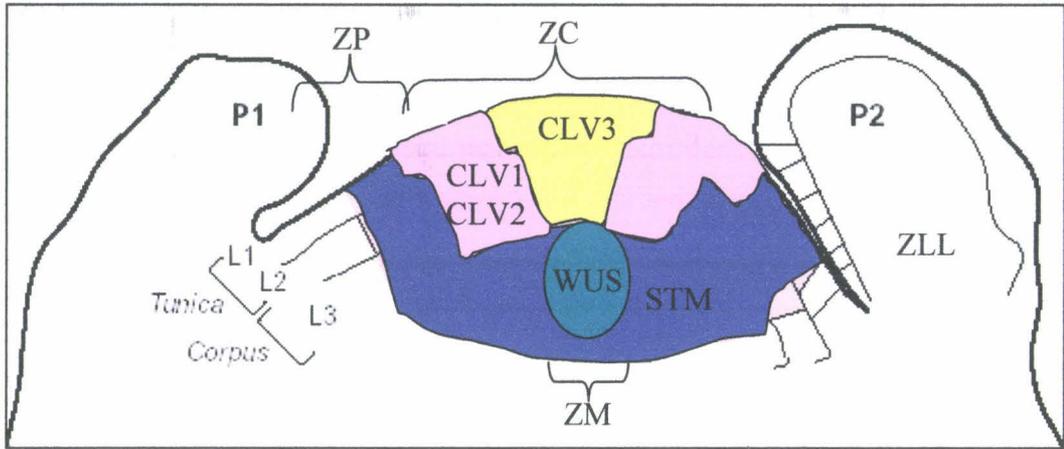
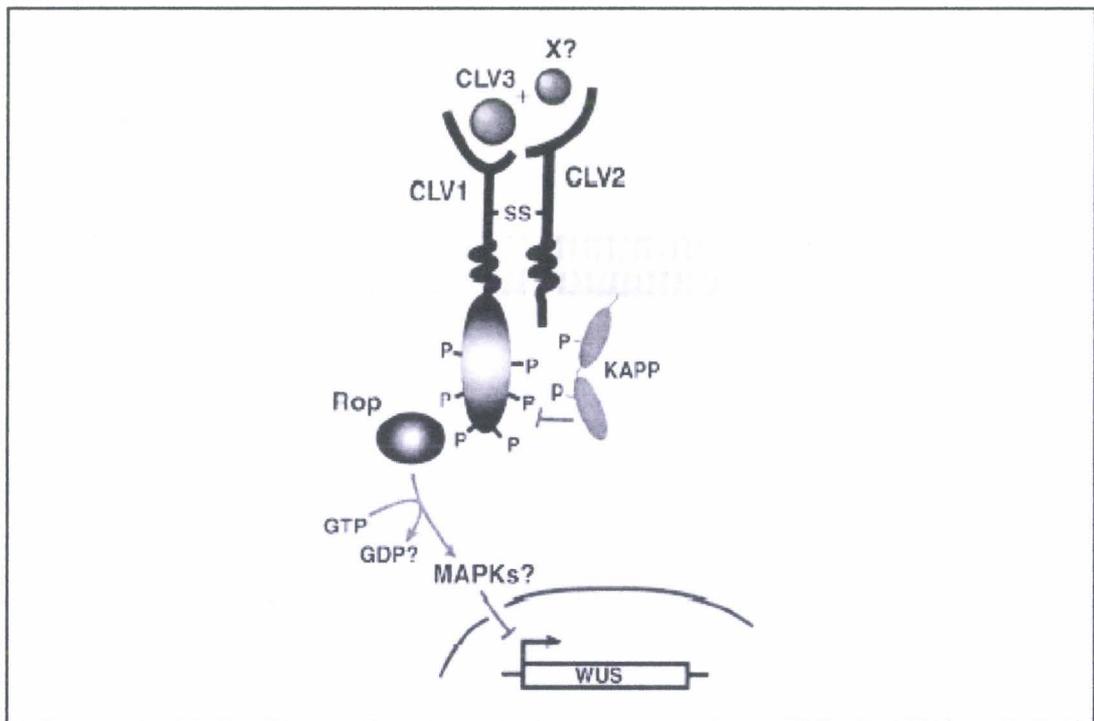


Figure 11: Modèle de fonctionnement du méristème apical. D'après Autran *et al.*, 2001
 Le méristème présente une zonation en tunica et corpus superposée à la zonation ZP, ZC et ZM. *WUS* est exprimé un peu dans la couche L3 au centre du méristème sous le domaine d'expression des gènes *CLV*. Les gènes *CLV* sont exprimés dans la zone centrale et partiellement chevauchant. *CLV1* est exprimé dans la couche L3 et fonctionne en dimère avec *CLV2*, et avec *CLV3*, ligand potentiel de *CLV1/CLV2*, qui est exprimé dans les couches L1 et L2. *STM* est exprimé dans le méristème mais pas dans les primordia d'organes. Les transcrits *ZLL* sont retrouvés dans les cellules provasculaires dans les primordia d'organes.



Encadré 2 : Modèle de fonctionnement biochimique de la voie de signalisation CLAVATA. D'après Fletcher *et al.*, 2002

Le modèle de fonctionnement biochimique de la voie de signalisation CLAVATA est bien connu. *CLV1* et *CLV2* sont liées ensemble pour former le complexe transmembranaire. *CLV1* est capable d'auto phosphorylation sur des résidus serine. Le complexe actif comprend plusieurs autres protéines cytosoliques. L'activation du complexe est possible par la liaison de *CLV3* et éventuellement d'une autre protéine (*X*) au complexe *CLV1/CLV2*. Le complexe actif comprendrait une protéine phosphatase *KAPP* (Kinase Associated Protein Phosphatase) qui se lierait à la forme phosphorylée de *CLV1* et fonctionnerait en atténuateur de la voie de signalisation *CLV1*. Un dernier composant du complexe est une protéine Rho-GTPase appelée *ROP* qui lui-même activé activerait la voie des *MAPK* dont la cible serait le gène *Wuschel* (Trotochaud *et al.*, 1999).

Cette régulation mutuelle impliquant des interactions positives et négatives permet une boucle de retro-contrôle qui maintient la balance entre la prolifération cellulaire et la différenciation cellulaire.

3. Modèle de fonctionnement du MAC

A partir de l'étude des mutants et des profils d'expression spatio-temporelle des différents gènes, il est possible de définir un modèle de fonctionnement du MAC (Figure 11). Le méristème est alors organisé en ZC, ZM et ZP avec en superposition les trois couches cellulaires L1, L2 et L3.

Un premier jeu de gènes peut être localisé au sein du méristème en fonction de son rôle de maintien de cellules souches. Chez les mutants *wus*, il n'y a pas de maintien des cellules souches, l'organisation du MAC est défectueuse. *WUS* est exprimé un peu dans la couche L3 au centre du méristème sous le domaine d'expression des gènes *CLV*. Les mutations dans les gènes *CLV* se traduisent par un élargissement de la zone centrale du MAC, ces gènes sont donc nécessaires pour empêcher l'accumulation de cellules indifférenciées aux niveau des MAC. *WUS* et *CLV3* forment une boucle de rétro-contrôle entre maintien des cellules souches et différenciation cellulaire. Les gènes *CLV* sont exprimés dans la zone centrale du méristème. *CLV1* est exprimé dans la couche L3 et interagit avec *CLV2*, et avec *CLV3*, ligand de *CLV1*, qui est exprimé dans les couches L1 et L2. Un modèle de fonctionnement biochimique de la voie de signalisation CLAVATA a pu être proposé (encadré 2).

Un autre gène clé dans le méristème fait partie des gènes qui permettent la prolifération des cellules souches, à savoir *STM*. Une mutation dans le gène *STM* induit une consommation des cellules du méristème, ce gène semble donc impliqué dans le maintien du méristème. *STM* est exprimé dans le méristème mais pas dans les primordia d'organes. Les localisations différentes des transcrits de *STM* et *WUS* sont confirmées par leur rôle différent au sein du méristème mais qui concourent à la même fonction de maintien du méristème (Lenhard *et al.*, 2002).

Par ailleurs, il faut noter l'interaction entre *STM* et *CUC2* (*CUPSHAPEDCOTYLEDONS*) puisque *STM* est nécessaire à l'expression correcte de *CUC2* et que la fonction de *CUC* est requise pour l'expression de *STM* (Aida *et al.*, 1999).

La mutation *zll* est visible dans les embryons matures, où l'on ne détecte pas de cellule méristématique caractéristique du méristème en formation. Au cours du développement post

Etude bibliographique

embryonnaires, les transcrits *ZLL* sont retrouvés dans les cellules provasculaires dans les primordia d'organe. L'organisation et le maintien du méristème sont donc sous le contrôle d'une régulation fine entre différents gènes interagissant entre eux.

MATERIEL et METHODES

Matériel et méthodes

1. Matériel végétal :

La chicorée est utilisée au laboratoire comme modèle d'étude de l'embryogenèse somatique depuis 1985 (Dubois *et al.*, 1988; Guerida *et al.*, 1989). Jusqu'à récemment, les travaux ont été réalisés sur le génotype embryogène 474 qui était jusque là la seule source d'embryogenèse somatique connue chez la chicorée. Ce clone, maintenu par embryogenèse somatique et organogenèse, est un hybride interspécifique issu du croisement entre *Cichorium intybus* (génotype sélectionné par les Ets Florimond-Desprez) et *Cichorium endivia* (variété population de scarole Catalane, Ets Vilmorin). Les contrôles non embryogènes, utilisés dans les différentes études menées au laboratoire, étaient des variétés commerciales de *C. intybus*, très éloignées génétiquement du génotype "474".

Avec l'objectif d'obtenir des génotypes embryogènes et non embryogènes les plus isogéniques possible, des tests de la potentialité embryogène de différentes variétés de scaroles, dont la population Catalane, ont été réalisés au laboratoire afin de rechercher si le caractère embryogène du clone "474" avait été transmis par le parent *C. endivia*. Aucun des génotypes de scaroles testés n'a présenté une réponse à l'induction de l'embryogenèse somatique comparable à celle observée pour le clone "474" (J. Dubois et J.P. Couillerot, communication personnelle).

L'origine du caractère embryogène a ensuite été recherchée dans la population Kospol à l'origine du parent *C. intybus* du clone 474. Cette variété population de chicorées industrielles provient de Hongrie et est maintenue dans la collection de ressources génétiques des Ets Florimond-Desprez. En 1999, 150 individus de la population Kospol ont été testés pour leur potentialité embryogène, dans les conditions de culture des explants optimisées pour le génotype 474 (Bellettre *et al.*, 2001). Ces tests réalisés à partir de feuilles et de racines ont permis une sélection d'individus à comportements extrêmes. En particulier, une plante très embryogène sur feuilles et racines a été identifiée, il s'agit du génotype K59 (B. Delbreil et M.C. Quillet, résultats non publiés). Ce clone est depuis lors maintenu au laboratoire par embryogenèse somatique et organogenèse.

Au cours de l'été 2000, des autofécondations du génotype K59 ont été réalisées dans l'objectif de sélectionner d'éventuelles plantes non embryogènes dans la descendance. Malgré plusieurs dizaines de capitules pollinisés, seulement 20 graines issues d'autofécondation de

Matériel et méthodes

K59 ont pu être obtenues. En effet, *C. intybus* est une espèce où l'auto-incompatibilité est fréquente, ce qui explique le faible nombre de graines produites. Ces 20 plantes ont ensuite été testées pour leur potentiel embryogène sur feuilles et sur racines. Une ségrégation pour l'aptitude à produire des embryons somatiques *in vitro* est apparue dans cette descendance, indiquant que le clone K59 ne possède pas à l'état homozygote les facteurs génétiques impliqués dans le déterminisme de ce caractère. Cette étude a permis l'identification de 4 individus à comportement extrêmes: 2 plantes non embryogènes (C14 et C15) et 2 plantes embryogènes (C7 et C8).

Parallèlement à ces autofécondations, une descendance destinée à étudier le déterminisme génétique de l'embryogenèse somatique de la chicorée a été obtenue au cours de l'été 2000, en réalisant un croisement entre les plantes K59 et K28. Le génotype K28 est une plante faiblement embryogène, identifiée lors du crible de la population Kospol qui a permis la sélection de K59.

Nous avons utilisé plusieurs types de matériel végétal au cours des différentes expériences présentées dans ce mémoire.

Pour cloner les ADNc *CiCLV1p* et *CiSTM*, des ARN extraits de feuilles de l'hybride "474" cultivées *in vitro* en conditions d'induction de l'embryogenèse somatique ont été utilisés. Cette partie des travaux de la thèse a été initiée alors que la caractérisation des génotypes issus de la population Kospol était en cours, ce qui explique pourquoi les clonages n'ont pas été réalisés à partir d'extraits du génotype K59.

Les aspects cytologiques de l'embryogenèse somatique ont été abordés à partir d'explants foliaires de plantes cultivées en serre des génotypes K59, C7, C8, C14 et C15 ainsi qu'à partir de racines de plantes cultivées *in vitro* des génotypes K59 et C15.

Une partie des explants de feuilles des cinétiques C15 et K59 a été utilisée afin d'extraire les ARN destinés à suivre l'accumulation des transcrits des gènes *CiCLV1p* et *CiSTM* par PCR en temps réel.

Le suivi cytologique du développement des embryons zygotiques de chicorée a été réalisé à partir d'akènes récoltés sur des individus de la descendance K28 × K59, pollinisés manuellement. Une partie de ces akènes a été utilisée pour extraire les ARN qui ont permis de suivre l'accumulation des transcrits des gènes *CiCLV1* et *CiSTM* au cours de l'embryogenèse zygotique.

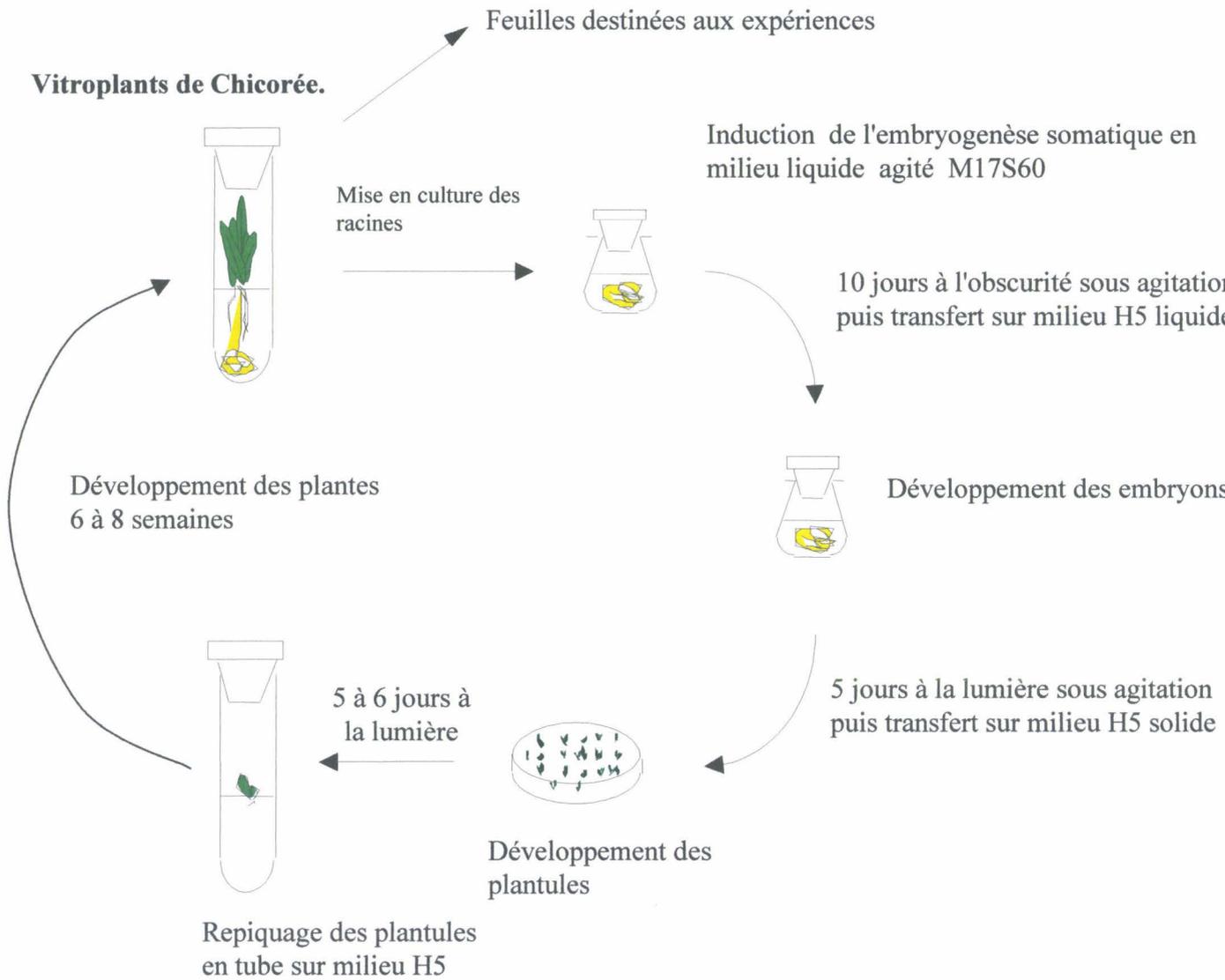


Figure 12 : Régénération du matériel végétal par embryogenèse somatique à partir de racines.

2. Conditions de culture *in vitro*:

2.1. Maintien du matériel végétal par embryogenèse somatique et par organogenèse.

Les génotypes embryogènes utilisés dans les différentes expériences sont multipliés par embryogenèse somatique ou organogenèse, tandis que les génotypes non embryogènes ne peuvent être maintenus que par organogenèse. Les embryons somatiques sont initiés à partir d'explants racinaires car les embryons se détachent facilement de la racine (ce qui n'est pas le cas pour les embryons initiés à partir de feuilles). Pour l'organogenèse, différentes parties des plantules cultivées *in vitro* ont été testées et se sont avérées peu réactives. Par contre, une bonne réactivité a été trouvée pour les feuilles des plantes cultivées en serre qu'elles soient embryogènes ou non embryogènes.

2.1.1. Embryogenèse somatique.

Les explants utilisés pour la multiplication des génotypes embryogènes sont issus de vitroplants âgés de 6 à 8 semaines qui proviennent de la conversion d'embryons somatiques obtenus par culture de racines de plantules *in vitro*.

Les racines excisées sont cultivées dans des Erlenmeyers contenant 20 ml de milieu M17S60 (Annexe 1) à l'obscurité sous agitation et à 35°C (figure 12). Après 10 jours de culture, les embryons somatiques sont transférés dans un milieu H5 liquide (Annexe 2) et cultivés pendant 5 jours à la lumière.

Les embryons somatiques chlorophylliens les mieux développés sont alors repiqués en boîte de Pétri sur un milieu H5 solide (Annexe 2) pour permettre le développement en plantules. Les cultures sont maintenues sous une photopériode 16h/8h avec 22°C pendant la phase lumineuse et 20°C pendant la phase sombre.

Le développement en plantes s'effectue en tube sur le même milieu et dans les mêmes conditions de culture. Après 6 à 8 semaines, les racines permettent de produire de nouvelles plantes.

2.1.2. Organogenèse.

Des feuilles de plantes cultivées en serre sont prélevées et aseptisées (Annexe 3). Des fragments sont découpés en incluant la nervure centrale de la feuille qui est la zone la plus réactive.

Ces fragments sont répartis en boîtes de Pétri (figure 13) contenant du milieu de bourgeonnement Bg 0,5 (Annexe 4). Ces fragments sont cultivés pendant 15 à 20 jours sous

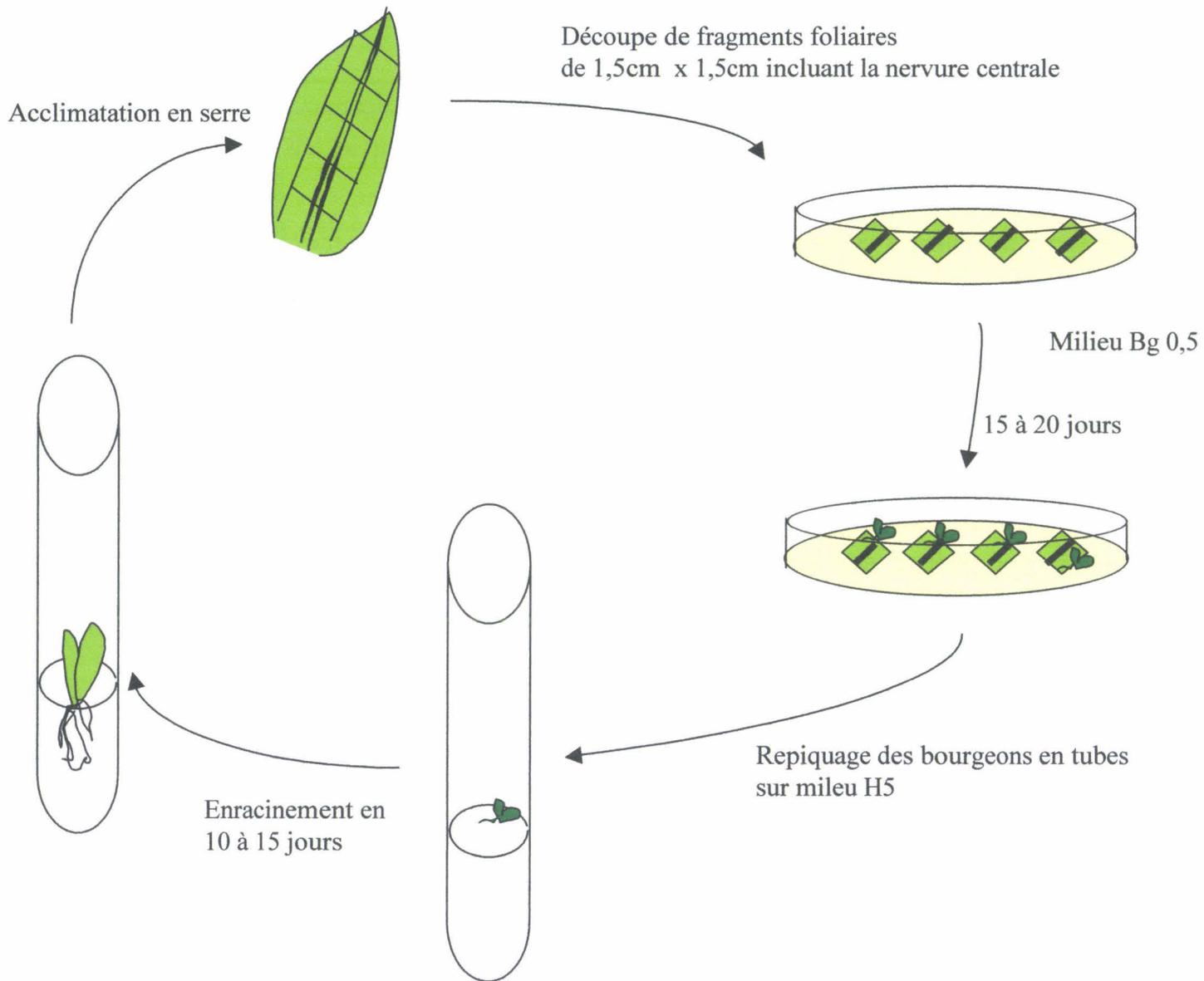


Figure 13 : Régénération de matériel végétal par organogenèse à partir de fragments foliaires aseptisés

les conditions suivantes : 16 heures de lumière à 24°C et 8 heures d'obscurité à 20°C. Les bourgeons possédant des feuilles de plus de 1 cm sont repiqués en tube contenant du H5 solide. L'enracinement de ces bourgeons se réalise en 10 à 15 jours après le transfert en tube.

2.2. Mise en culture de fragments de feuilles et de racines destinés aux manipulations

Des feuilles issues de plantes acclimatées en serre depuis 1 à 2 mois sont aseptisées (Annexe 3) et découpées en rectangles de 1 centimètre sur 0,2 centimètre le long de la nervure centrale (Figure 14). Dix fragments sont ensuite répartis de façon aléatoire dans différentes fioles de culture de 50 ml afin d'homogénéiser le contenu des fioles. Les fioles sont fermées par des bouchons de cellulose pressée.

Pour les plantules *in vitro* de l'hybride "474", les conditions de culture étaient différentes. En effet, trois fragments par feuille étaient prélevés et répartis de façon aléatoire dans différentes fioles.

Les fragments de feuilles (*in vitro* ou serre) sont cultivés dans 20 ml de milieu M17S60 (Annexe 1) additionné ou non de 330 mM de glycérol (Robatche-Claive *et al.*, 1992). Les cultures sont placées à l'obscurité à 35°C sous agitation (80 rpm).

Les fragments foliaires sont transférés le quatrième jour dans le cas de culture initiées en présence de glycérol dans le milieu M17S60 dépourvu de glycérol (Annexe 1). La culture se poursuit jusqu'au douzième jour dans les mêmes conditions.

Les racines des plantules *in vitro* sont cultivées en absence de glycérol car des observations réalisées sur des cultures racinaires de l'hybride "474" ont montré que le glycérol n'avait pas l'effet de relative synchronisation de la première division (Blervacq, communication personnelle).

Des prélèvements sont réalisés quotidiennement entre les premier et douzième jour de la culture en vue de l'extraction des ARN. Ces fragments foliaires sont congelés dans l'azote liquide et stockés à -80°C avant extraction. De plus, des fragments de feuilles sont fixés dans du FAE (Annexe 5) aux différents jours de la cinétique en vue d'une étude cytologique.

3. Réalisation d'une cinétique d'embryogenèse zygotique.

Des pollinisations manuelles entre individus de la descendance K28 × K59 sélectionnés au hasard ont été réalisées au mois de juin 2002. Des prélèvements ont été

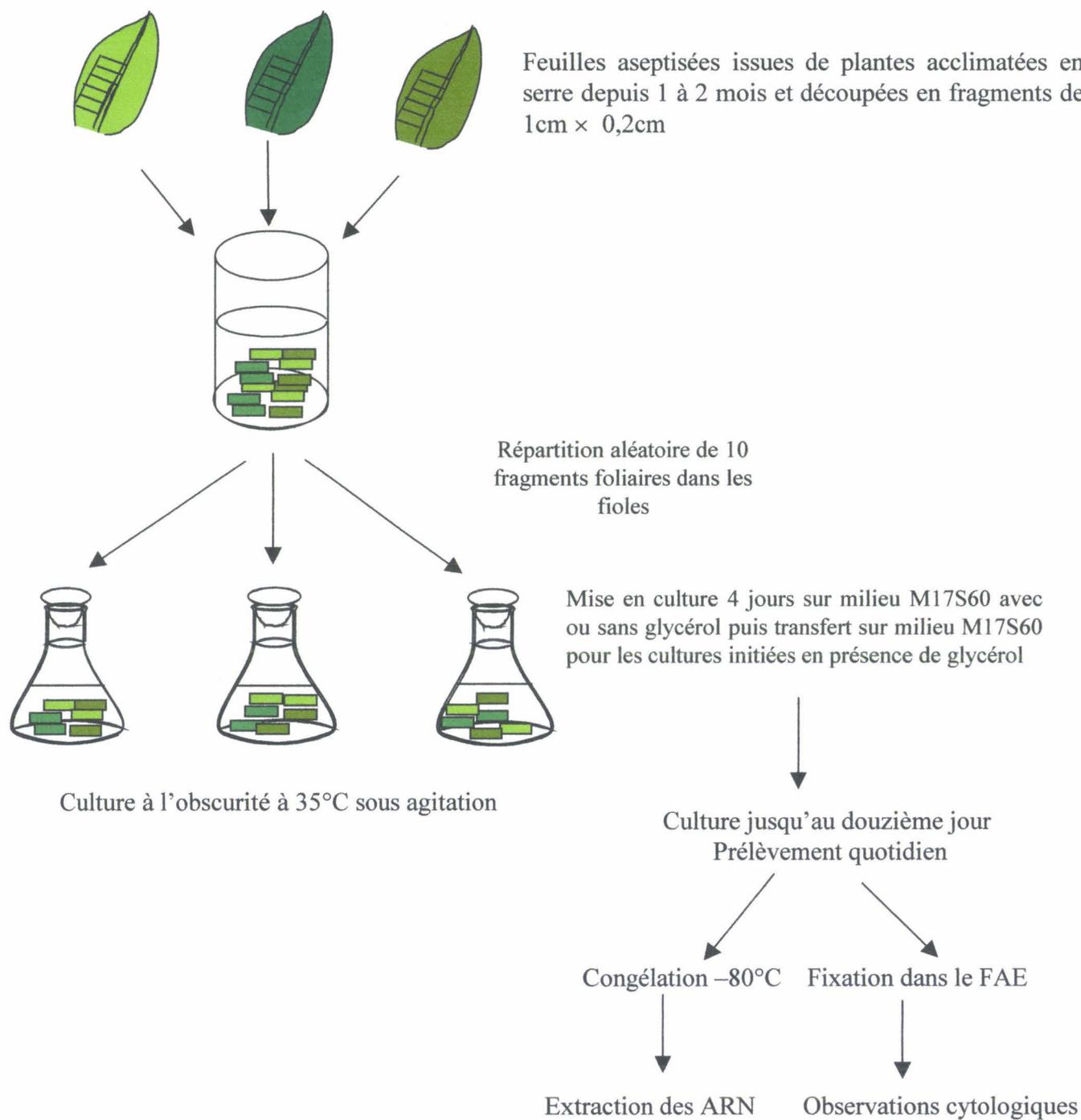


Figure 14 : Mise en culture des fragments foliaires pour l'étude de l'embryogenèse somatique

effectués avant pollinisation puis aux premier, deuxième troisième, quatrième, cinquième, sixième, septième, neuvième, onzième, treizième, quinzième, dix septième, dix neuvième et vingt deuxième jour après la pollinisation. Les fleurs ont été disséquées et les akènes récoltés. Une partie de ces akènes a été fixée dans le FAE (Annexe 5), la seconde partie de ces akènes a été congelée en vue de l'extraction des ARN. Pour chaque point de la cinétique, au moins dix capitules prélevés sur des plantes différentes ont été récoltés en mélange.

4. Techniques relatives au clonage des ADNc

4.1. Extraction des ARN totaux.

Environ 150 à 200 milligrammes de tissus (feuilles, racines ou akènes) sont broyés dans l'azote liquide jusqu'à obtention d'une poudre fine. Les ARN totaux sont extraits avec le réactif TRI REAGENT[®] suivant le protocole indiqué par le fournisseur (Annexe 6).

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

4.2. Définition des amorces dégénérées destinées au clonage des séquences partielles des gènes candidats *CiSTM* et *CiCLV1p*

Les ARN ont été extraits pour toutes les étapes du clonage à partir de fragments foliaires de l'hybride "474". Les transcriptions inverses (RT) ont été réalisées sur un mélange d'ARN extraits aux différents jours de la culture : J0, J1, J2, J3, J4, J5 et J8.

La stratégie utilisée est celle décrite par Rose *et al.* en 1998. Elle consiste en l'utilisation, pour la PCR, d'amorces dégénérées définies en fonction de séquence consensus protéique et de la dégénérescence du code génétique. Les amorces sont définies à l'aide du logiciel CODEHOP : COnsensus DEgenerate Hybrid Oligonucleotides Primers. Ce programme de définition d'amorces est accessible sur le réseau internet : <http://blocks.fhrc.org/codehop.html>.

La séquence protéique candidate est alignée avec des séquences protéiques les plus proches et appartenant à la même famille. Des régions hautement conservées sont identifiées et servent à l'établissement de blocs de séquence qui serviront à la définition des amorces.

Il est ensuite nécessaire de choisir une utilisation préférentielle du code génétique. L'utilisation préférentielle du code génétique chez la chicorée n'étant pas connue, nous avons choisi que les amorces soient définies selon le biais d'utilisation du code génétique chez l'espèce modèle des Dicotylédones : *Arabidopsis thaliana*.

Les amorces sont ensuite proposées par le programme. Elles comportent en 5' une région non dégénérée qui permet l'ancrage à la séquence cible de l'amorce et une région en 3' plus courte et dégénérée. L'hybridation de la région 3' dégénérée est stabilisée par la région 5' non dégénérée. Plusieurs amorces sont proposées avec des niveaux de dégénérescence différents qui correspondent aux nombres d'amorces présentes en mélange dans la solution de synthèse. Les amorces les moins dégénérées seront choisies en priorité.

4.3. La transcription inverse :

La quantité totale d'ARNm utilisée pour réaliser cette transcription inverse est de 5 µg. La RT est réalisée grâce au kit " SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR" de Invitrogen selon le protocole du fournisseur donné en Annexe 7. La RT est réalisée grâce à une amorce poly d(T) ou avec une amorce de séquence aléatoire selon l'utilisation ultérieure des ADNc.

4.4. Amplification des ADNc avec les amorces dégénérées.

L'amplification est réalisée sur une dilution au 1/10 des produits de RT. Des couples d'amorces ont été testés pour amplifier des régions de *CiCLV1p* et de *CiSTM* correspondant aux régions conservées définies préalablement.

Plusieurs conditions de PCR ont été testées de manière à obtenir les quantités maximales de produits de PCR en vue du clonage des fragments. En particulier, du fait de l'utilisation d'amorces dégénérées, nous avons optimisé les quantités d'amorce de manière à obtenir les signaux les plus intenses et les plus nets possibles.

Les réactions de PCR sont réalisées dans un volume de 30 µl avec les réactifs suivants :

- GeneAmp PCR Gold Buffer (1× final) (Applied Biosystems)
- 2 mM MgCl₂ final
- 0,2 mM dNTP final
- Amorces 1 et 2 en quantité variable (4 à 32 pmol)
- 0,75 U de AmpliTaq®Gold DNA Polymerase (5U/µl) (Applied Biosystems).

Matériel et méthodes

Les conditions de PCR qui ont été optimisées pour ce type d'amplification sont les suivantes:

4 minutes à 92°C
30 secondes à 94°C }
30 secondes à 50°C } 45 cycles
1 minute 30 à 72°C }
7 minutes à 72°C

Les produits de PCR sont ensuite purifiés grâce au kit QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen) selon les instructions du fournisseur (Annexe 8). Les produits de PCR sont élués dans 50 µl de tampon EB (Tris-HCl 10 mM, pH 8,5). La concentration des produits de PCR est estimée sur gel d'agarose par comparaison avec les bandes d'un marqueur de taille (Smartladder, Eurogentec).

4.5. Ligature des produits de PCR.

Les produits de taille attendue sont insérés dans le plasmide pGEM®-Teasy vector (Promega) selon les instructions du fournisseur (Annexe 9). La ligature se déroule pendant une nuit à 4°C. La quantité de produit de PCR à utiliser dépend de la taille du fragment ce qui va déterminer le nombre de molécules de vecteur à utiliser par rapport au nombre de molécules d'insert. Le rapport 1/3 est généralement utilisé, c'est à dire qu'il faut 1 molécule d'insert pour 3 molécules de vecteur pour obtenir une ligature optimale. La quantité d'insert nécessaire à la ligature est donnée par la formule :

$$\text{Quantité d'insert en ng} = \frac{3}{1} * \frac{\text{Quantité de vecteur (ng)}}{\text{Taille vecteur (kb)}} * \frac{1}{\text{Taille insert (kb)}}$$

La qualité de la ligature peut être vérifiée sur gel d'agarose à 0,8%.

4.6. Transformation de bactéries compétentes.

Les bactéries de la souche compétente JM 109 de *E.coli* (Promega) sont transformées avec le vecteur contenant l'insert. Pour cela, les tubes de polypropylène sont refroidis dans la glace pendant 5 minutes. Le mélange de ligature est ajouté à 100 µl de bactéries compétentes.

Matériel et méthodes

Après 10 minutes sur glace, un choc thermique est appliqué à 42°C pendant 45 secondes. Une préculture est ensuite réalisée pendant une heure à 37°C sous agitation (120 rpm) après ajout de 900 µl de milieu SOC (Annexe 10).

Les cellules transformées sont étalées sur boîte de Pétri contenant du milieu LB additionné d'ampiciline (50 mg.L⁻¹), de X gal (800 mg.L⁻¹) et d'IPTG (0,1 M).

Les colonies blanches (bactéries contenant un vecteur et l'insert) sont transférées dans 50 µl de TTE : Tris Triton EDTA (Annexe 11) à l'aide d'un cône et incubées 10 minutes à 96°C pour lyser les bactéries. L'ensemble est centrifugé pendant 10 minutes à 15 000 g.

4.7. Amplification des clones par PCR

Afin de sélectionner les clones dont l'insert correspond à la taille attendue, une réaction de PCR est réalisée. Les amorces utilisées sont les amorces universelles M13 Reverse et M13 Forward dont les séquences sont retrouvées sur le vecteur de part et d'autre du site multiple de clonage (Annexe 9). Les amplifications sont réalisées dans 15 µl avec les réactifs suivants :

- Tampon Taq 10 × (1× final) (Appligène)
- 1 mM MgCl₂ final
- 0,1 mM dNTP final
- 4 pmol Amorce M13F final
- 4 pmol Amorce M13R final
- 1,5 µl de culture bactérienne lysée dans du TTE
- 0,45 U Taq DNA polymérase (Appligène)

Les conditions de PCR sont les suivantes :

4 minutes à 92°C
30 secondes à 94°C
30 secondes à 55°C
1 minute 30 à 72°C
7 minutes à 72°C

} 35 cycles

Une migration en gel d'agarose permet de sélectionner les clones de taille attendue. Ces inserts sont amplifiés par PCR en plus grand volume en vue du séquençage.

4.8. Séquençage des fragments clonés

Soixante µl de produits de PCR sont précipités par ajout de 1/10^{ème} de volume d'acétate de sodium 3 M, pH 5,2 et 2,5 volume d'éthanol absolu pendant une heure à -80°C, avant d'être centrifugés 20 minutes à 15000 g. Le surnageant est éliminé et le culot est rincé deux fois à l'éthanol 70%, séché puis resuspendu dans 25 µl de tampon EB (Tris-HCl 10 mM, pH 8,5).

Cette solution est utilisée pour le séquençage avec le kit "ABI PRISM Dye Primer Cycle Sequencing Core Kit", (Applied Biosystems). Les réactions de séquence sont réalisées suivant le protocole donné en annexe 12. La réaction est initiée grâce à des amorces Sp6 ou T7, présentes sur le vecteur (Annexe 9). Ces amorces sont marquées en 5' par un fluorochrome (IRD 800 : Infra Red Detection) qui émet une fluorescence après une excitation par un laser basse tension. Cette fluorescence est enregistrée par le séquenceur automatique (Licor[®] 4200 IR DNA sequencer) qui renvoie l'information à un logiciel qui se charge de traduire ce signal en image. Il est alors possible de déterminer la séquence du fragment.

4.9. PCR inverse à partir de matrices ADNc

Cette technique a d'abord été mise au point sur de l'ADN par Ochman *et al.*, en 1988. Le but était d'amplifier des régions adjacentes inconnues à une région connue d'ADN. Cette technique utilise la réaction de PCR mais avec des amorces orientées dans le sens inverse par rapport au sens habituel.

Le protocole d'amplification a ensuite été adapté pour amplifier des régions adjacentes à des régions connues d'ADNc, dans le but final d'obtenir des ADNc de pleine longueur (Duban, 2000).

Pour réaliser cette amplification sur des ADNc, plusieurs modifications du protocole original ont dû être réalisées. Les différentes étapes sont décrites sur la figure 15.

Les amorces de PCR inverse ont été définies à partir des séquences partielles obtenues à l'issue de l'amplification avec les amorces dégénérées.

4.9.1. Synthèse du premier brin d'ADNc

La synthèse du premier brin d'ADNc est réalisée selon le protocole donné en Annexe 6. L'amorce poly d(T) utilisée pour initier la réaction est modifiée et comprend des bases supplémentaires en 5' dont une partie correspond à un site de restriction.

Matériel et méthodes

Plusieurs amorces poly d(T) ont été utilisées (les sites de restriction sont soulignés dans les amorces) :

Poly d(T) SalI 5' GGCCACGCGTCGACTAGTAC(T)₁₅ 3'

Poly d(T) NsiI 5' ACTCAAGCTATGCATCCAACG(T)₁₅ 3'

Poly d(T) XhoI 5' GGCCACGCCTCGAGTAGTAC(T)₁₅ 3'

Poly d(T) KpnI 5'GGCCACGCGTACCTAGTAC(T)₁₅ 3'

A l'issue de la réaction de RT, la transcriptase inverse est inactivée 15 minutes à 70°C et les ARN sont dégradés pendant 20 minutes à 37°C en présence de 2 unités de RNase H issue d'*E coli*.

Ces premiers brins d'ADNc sont alors purifiés et élués dans 50 µl de tampon EB (Qiaquick PCR Purification Kit) et concentrés à 28 µl.

4.9.2. Poly-adénylation des premiers brins d'ADNc

La poly-adénylation est réalisée dans un volume de 50 µl sur l'ensemble des premiers brins d'ADNc (28 µl). La transférase terminale (Roche) ajoute des dATP en 3' des premiers brins en présence de 10 µl de tampon 5X, 4 µl d'enzyme, 3 µl de CoCl₂ à 25 mM et 3,1 µl de dATP à 100 µM. La poly-adénylation se déroule à 37°C pendant 15 minutes. L'enzyme est ensuite inactivée à 70°C pendant 10 minutes. Les produits sont purifiés comme lors de l'étape précédente et concentrés à 36 µl.

4.9.3. Synthèse des seconds brins d'ADNc

La synthèse des seconds brins est réalisée par une Taq polymérase dans un volume final de 50 µl sur l'ensemble des premiers brins poly- adénylés purifiés (36 µl).

Le mélange réactionnel de 50 µl se compose de :

- Gold Buffer 10× (1× final) (Applied Biosystems)
- 2 mM MgCl₂ final,
- 0,2 mM dNTP final
- 2,5 U de AmpliTaq®Gold DNA Polymerase (5U/µl) (Applied Biosystems)
- 20 pmol d'amorce poly d(T)

L'amorce utilisée pour la synthèse des seconds brins d'ADNc est un poly d(T) modifié en 5' et comprenant le même site de restriction que celui utilisé pour la synthèse des premiers brins. Ces étapes aboutissent donc à la synthèse d'une population d'ADNc double brin comprenant en leur deux extrémités le même site de restriction.

Matériel et méthodes

l'ensemble des ADNc doubles brins amplifiés et purifiés (40 µl) en présence de 5 µl de tampon 10×, 1 µl d'enzyme dans un volume total de 50 µl pendant 3 heures à 37°C.

Les produits sont purifiés sur colonne (Qiaquick PCR Purification Kit) et élués dans 50 µl.

4.9.6. Autoligature des ADNc doubles brins

Les ADNc doubles brins digérés possèdent en leur deux extrémités le même site de restriction. Ceci rend donc possible une autoligature de ces derniers.

L'autoligature est réalisée grâce à l'ADN Ligase T4 (Biolabs) dans un volume final de 300 µl pendant une nuit à 16°C en présence de 30 µl de tampon 10× et 1 µl d'enzyme. Le grand volume utilisé favorise l'autoligature par rapport à la ligature entre molécules différentes.

Les autoligatures sont précipitées dans de l'éthanol absolu (2,5 volumes) et de l'acétate de sodium 3 M pH 5,2 (1/10 volume) pendant une heure à -80°C. Après centrifugation pendant 20 minutes à 15000 g, les culots sont rincés avec de l'éthanol 70% et centrifugés 10 minutes à 15000 g. Le rinçage est réalisé deux fois. Les culots sont ensuite séchés et repris dans 20 µl de tampon EB (Tris HCl 10 mM, pH 8,5).

4.9.7. PCR inverse

La première PCR inverse est réalisée dans 15 µl avec les réactifs suivants :

- 0,4 U d'AmpliTaq DNA Polymerase (5 U/µl) (Applied Biosystems)
- GeneAmp PCR Buffer (1× final) (Applied Biosystems)
- 2 mM de MgCl₂ final
- 0,2 mM de dNTP final
- 4 pmol de chaque amorce.
- 1 µl d'ADNc autoligués

Le volume est ajusté à 15 µl avec de l'eau ultra pure.

Les conditions de PCR sont les suivantes :

4 minutes à 92°C	} 25 cycles
30 secondes à 94°C	
30 secondes à 55°C	
1 minute 30 à 72°C	
7 minutes à 72°C	

Matériel et méthodes

Une seconde PCR est réalisée à partir des produits de la première PCR avec des amorces définies de manière à augmenter la spécificité d'amplification. Les conditions de PCR sont identiques à la première PCR mais réalisées avec 45 cycles.

La qualité des produits obtenus est ensuite vérifiée par migration sur gel d'agarose à 1%. Si un fragment est obtenu à la taille attendue, ce dernier sera alors accumulé et cloné en vue d'être séquencé comme décrit dans le paragraphe 4.8.

4.10. Amplification des ADNc pleine longueur avec le kit Gene Racer™ (Invitrogen)

Cette technique a été utilisée pour tenter de cloner l'extrémité 5' de l'ADNc *CiCLV1p* toujours incomplet après différents essais de PCR inverse. Cette méthode nécessite plusieurs étapes qui résultent de la ligation sélective d'un oligonucléotide ARN aux extrémités 5' d'ARN messagers dont la coiffe a été éliminée (figure 16).

4.10.1. Purification ARN messagers

Les ARN messagers sont purifiés à partir de préparations d'ARN totaux grâce au kit Direct Quick Messenger RNA (Talent) selon les instructions du fournisseur (Annexe 13). L'extraction est réalisée sur un mélange de 500 µg d'ARN totaux extraits de fragments foliaires aux différents jours de culture de l'hybride "474". Après purification, les ARNm sont resuspendus dans 200 µl d'eau DEPC puis précipités avec 4 µl de glycogène (10 mg/ml), 20 µl d'acétate de sodium 3 M pH 5,2 et 440 µl d'éthanol 95%. La précipitation est réalisée une nuit à -20°C. Après centrifugation et rinçage, le culot est resuspendu dans 10 µl d'eau DEPC.

4.10.2. Déphosphorylation des messagers tronqués

La phosphatase est inactive sur les messagers pleine longueur qui possèdent une coiffe. Cette étape élimine donc une ligation ultérieure des messagers tronqués avec un oligonucléotide ARN. Les réactifs suivants sont mélangés dans un microtube :

- ARNm	4 µl (environ 2 µg)	
- Tampon 10× CIP	1 µl	
- RnaseOut™ (40U/µl)	1 µl	
- CIP* (10U/µl)	1 µl	
- H ₂ O DEPC	3 µl	*CIP : Calf Intestinal Phosphatase

Matériel et méthodes

Les solutions sont mélangées et incubées une heure à 50°C. Les ARNm déphosphorylés sont précipités, rincés et resuspendus dans 7 µl d'eau DEPC comme indiqués précédemment.

4.10.3. Destruction de la coiffe des ARN messagers

Le principe de cette étape est de détruire à l'aide d'une pyrophosphatase les coiffes des ARN messagers. Ce traitement laisse un phosphate libre nécessaire à la ligature de l'oligonucléotide ARN.

Les réactifs suivants sont mélangés dans un microtube :

- ARN déphosphorylés 7 µl
- Tampon 10× TAP 1 µl
- RNaseOut™ (40U/µl) 1 µl
- *TAP (0,5 U/µl) 1 µl

*TAP : Tobacco Acid Pyrophosphatase

Les réactifs sont homogénéisés doucement, centrifugés brièvement, incubés une heure à 37°C et précipités comme précédemment. Le culot est resuspendu dans 7 µl d'eau DEPC.

4.10.4. Ligature de l'oligonucléotide ARN

La ligature de l'oligonucléotide permettra l'hybridation d'une amorce PCR à l'extrémité 5' des ADNc.

Les 7 µl d'ARN sans coiffe sont ajoutés dans un tube contenant l'oligonucléotide ARN (0,25 µg). L'ensemble est incubé 5 minutes à 65°C et placé sur la glace et centrifugé brièvement.

Sont ensuite ajoutés :

- Tampon Ligase 10× 1 µl
- 10 Mm ATP 1 µl
- RNaseOUT™ (40U/µl) 1 µl
- ARN ligase T4 (5U/µl) 1 µl

L'ensemble est incubé une heure à 37°C, centrifugé et placé sur la glace. Les ARN sont à nouveau précipités et resuspendus dans 10 µl d'eau DEPC.

4.10.5. Transcription inverse des ARNm

La transcription inverse est réalisée sur les 10 µl d'ARN ligaturés à l'oligonucléotide selon le protocole donné en annexe 7.

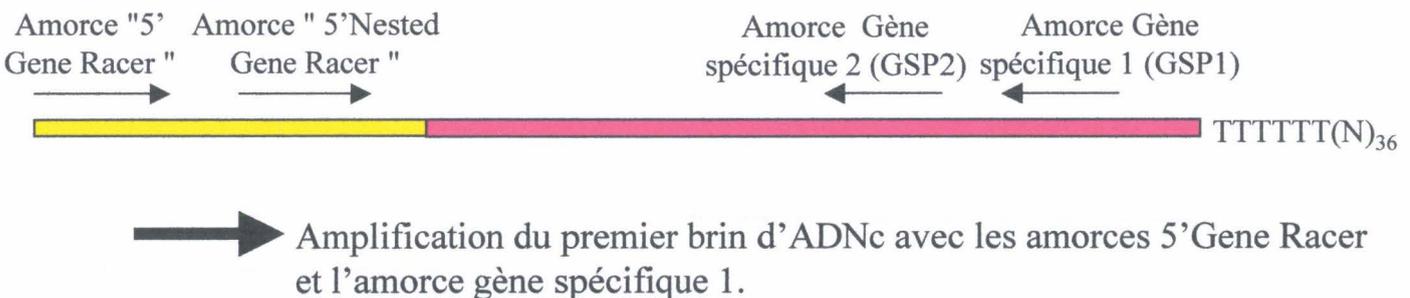
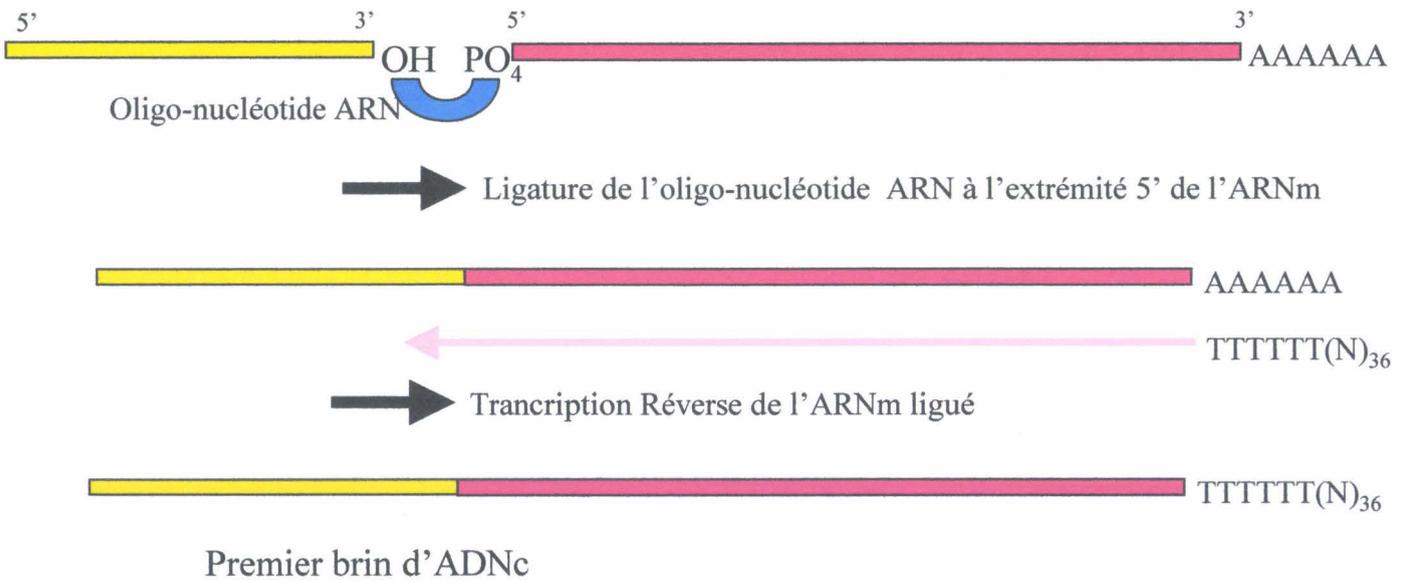
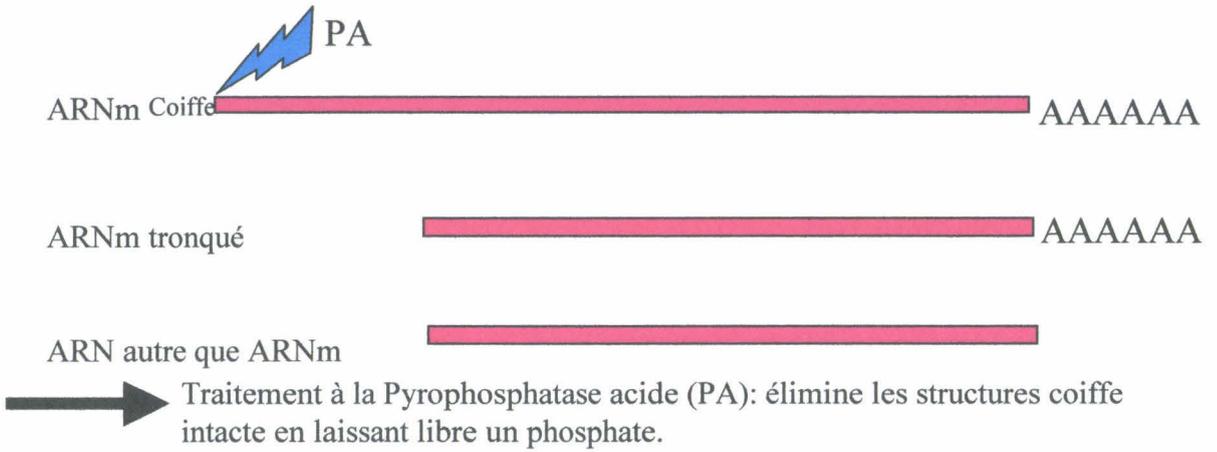
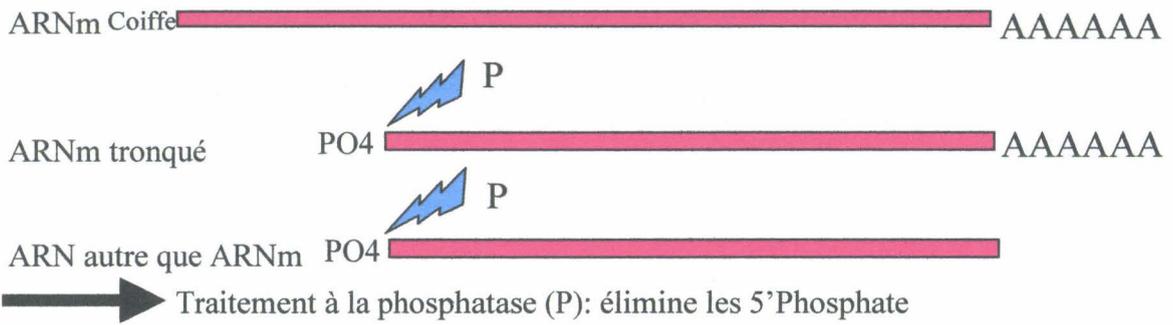


Figure 16: Principe de la réaction de Gene Racer

Matériel et méthodes

4.10.6. Amplification des extrémités 5' des ADNc

La réaction de PCR est réalisée sur des dilutions des produits transcription inverse. Des tests de dilutions ont été réalisés pour obtenir une amplification optimale. Les dilutions testées sont : 1/1, 1/3, 1/10 et 1/30.

Les amorces utilisées sont une amorce appelée "GeneRacerTM5'" complémentaire de l'oligonucléotide ARN ligaturé et une amorce appelée Reverse GSP1 (Gene Specific Primer1) définie sur la séquence disponible et dirigée vers l'extrémité 5' (Figure 16).

Les amplifications sont réalisées dans 50 µl avec les réactifs suivants :

- Amorce "GeneRacer TM 5'" (10 µM)	3 µl
- Amorce GSP1 (10 µM)	1 µl
- Premier brin d'ADNc	1 µl
- Tampon Taq High Fidelity 10× (Invitrogen)	5 µl
- dNTP (10 mM de chaque)	1 µl
- Taq Platinum® High Fidelity (5 U/µl)(Invitrogen)	0,5 µl
- MgSO ₄ , 50 mM	2 µl
- H ₂ O	QSP 50 µl

Un programme précis de PCR comprenant différentes phases avec des températures d'hybridation et d'élongation variables est utilisé de manière à augmenter la spécificité d'amplification et à diminuer le bruit de fond.

Les conditions de PCR sont les suivantes :

Température	Temps	Nombre de cycles
94°C	2 minutes	1
94°C	30 secondes	5
72°C	1 minute 30 (1 minute/Kb)	
94°C	30 secondes	5
70°C	1 minute 30 (1 minute/Kb)	
94°C	30 secondes	
60°C	30 secondes	20-25
68°C	1 minute 30 (1 minute/Kb)	
68°C	10 minutes	1

La qualité des produits de PCR peut être vérifiée en déposant 10 µl sur gel d'agarose à 1%.

Matériel et méthodes

Une seconde PCR est effectuée pour augmenter la spécificité d'amplification. Les amorces utilisées seront une amorce nommée "GeneRacerTM 5'Nested" complémentaire de l'oligonucléotide ligaturé et une amorce nommée GSP2 définie sur la partie de séquence disponible (Figure 16).

Les amplifications sont réalisées dans un volume de 50 μ l avec les réactifs suivants :

- Amorce "GeneRacer TM 5'Nested" (10 μ M)	3 μ l
- Amorce GSP2 (10 μ M)	1 μ l
- Produit première PCR	1 μ l
- Tampon Taq High Fidelity 10 \times	5 μ l
- dNTP (10 mM de chaque)	1 μ l
- Taq Platinum® High Fidelity (5 U/ μ l)	0,5 μ l
- MgSO ₄ , 50 mM	2 μ l
- H ₂ O	QSP 50 μ l

Les conditions de PCR sont les suivantes :

2 minutes à 94°C	} 25 cycles
30 secondes à 94°C	
30 secondes à 60-68°C	
2 minutes à 72°C	
10 minutes à 68°C	

La qualité des produits de PCR est vérifiée sur gel d'agarose. Si un fragment est obtenu à la taille attendue, les produits de PCR sont accumulés, purifiés et clonés en vue d'être séquencé, comme décrit dans les paragraphes 4.8.

5. RT-PCR en Temps Réel

5.1. Principe de la technique

La technique de PCR en temps réel combine l'amplification d'ADNc et la détection des produits dans un seul tube. La réaction d'amplification de la séquence cible suit les mêmes étapes qu'en PCR classique c'est-à-dire dénaturation, hybridation, extension.

En théorie, au cours d'une réaction de PCR, la quantité d'ADN est doublée à chaque cycle.

Après N cycles de PCR, on obtient théoriquement $(2)^N$ copies de chaque matrice initiale.

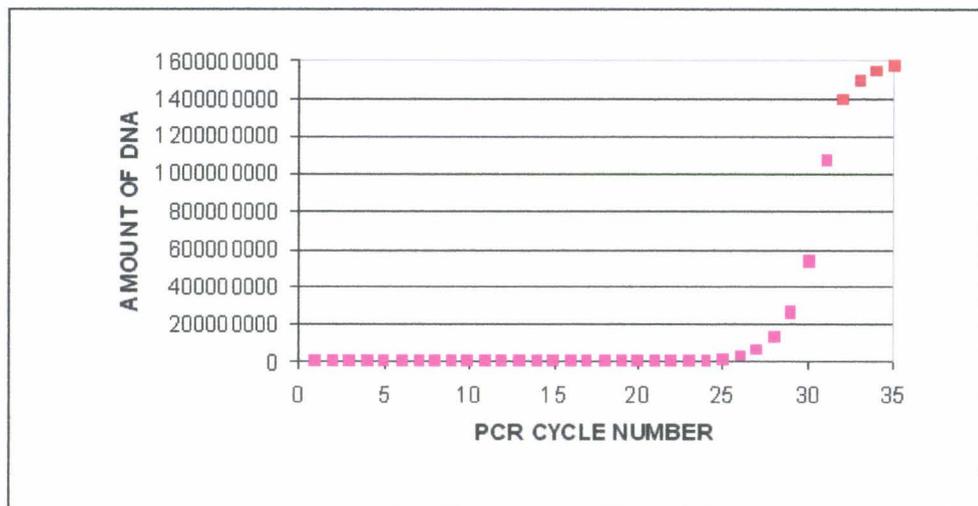


Figure 17 : Variation de la quantité d'ADN en fonction du nombre de cycles.

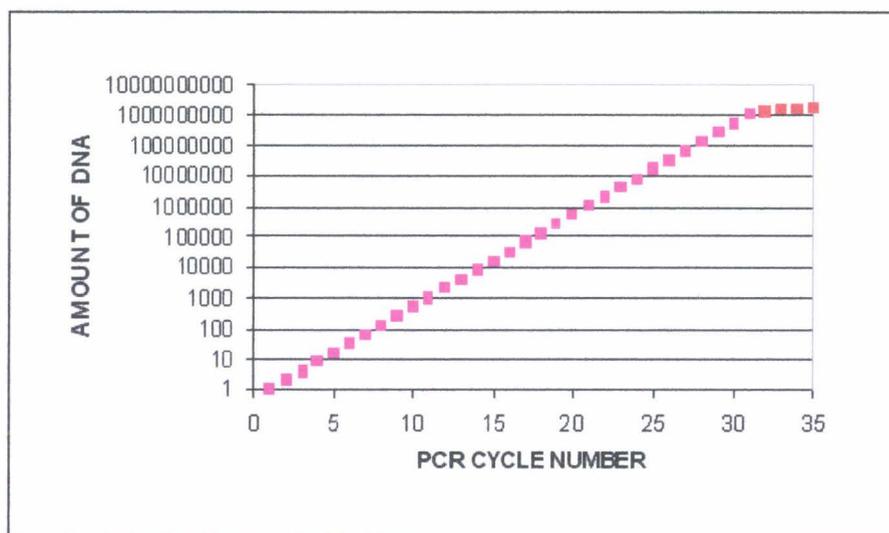


Figure 18 : Variation de la quantité d'ADN en fonction du nombre de cycles avec une représentation logarithmique.

Matériel et méthodes

En pratique, quand N est élevé, la réaction atteint un plateau à cause de facteurs limitants.

En effet, la figure 17 montre que l'on ne peut pas détecter les produits d'amplification dans les premiers cycles, la quantité étant trop faible pour être visualisée sur les gels d'agarose. Les produits ne pourront être visualisés qu'à partir des derniers cycles de la phase exponentielle et dans la phase de plateau (souvent au delà de 30 cycles d'amplification). En utilisant une représentation logarithmique (figure 18), on observe qu'à partir de 30 cycles, la proportionnalité entre la quantité d'ADN et le nombre de cycles n'est plus respectée. Dans ces conditions, il n'est pas possible de quantifier la quantité de matrice initiale.

En utilisant la technique de PCR en temps réel, il est possible de suivre la quantité de produit à chaque cycle d'amplification et de réaliser des mesures dans la phase exponentielle d'amplification. En effet, l'évolution de la quantité de produit est mesurée par fluorescence. Pour mesurer cette fluorescence, nous avons utilisé un fluorochrome, le SYBR green I. Il permet une détection des ADN double brin en se liant au petit sillon de l'ADN. Le principe est que le fluorochrome est excité par une longueur d'onde de 490 nm et émet une fluorescence à une longueur d'onde de 530 nm, proportionnelle à la quantité de SYBR Green I liée.

Le traitement informatique des signaux permet de reconstituer une courbe d'amplification représentée graphiquement par la fluorescence émise à chaque cycle de la réaction. La phase exponentielle de la réaction est alors visible sur le graphique. Le SYBR green I présente des facilités d'utilisation mais peut cependant se lier à n'importe quel double brin, produit spécifique, dimère d'amorce ou autre produit non spécifique.

En regard des autres techniques de biologie moléculaire classiquement utilisées pour étudier l'expression des gènes (PCR classique, Northern-Blot), la PCR en temps réel apporte une plus grande sensibilité. Elle est beaucoup moins exigeante sur les rendements en ARNm et assure un gain de temps indéniable.

La méthode d'analyse et d'interprétation des résultats sera détaillée dans le chapitre résultats.

5.2. Protocole expérimental.

Les ARNm sont transcrits inversement selon le protocole du fournisseur (iScript cDNA synthesis, Biorad). Des amorces spécifiques ont été définies à l'aide du logiciel

Matériel et méthodes

Beacon Designer[®] (Biosoft). Les amplicons doivent être courts : 75 à 150 paires de bases et le pourcentage de GC compris entre 30 et 70%.

Les amplifications concernant chacun des échantillons sont réalisées dans un volume final de 20 μ l avec les réactifs suivants :

- 2 \times Quantitech SYBER Green Mix (Qiagen)	10 μ l
- Fluoréscéine (1 μ M) (10 nM final)	0,2 μ l
- Amorces 1 (10 μ M) (375 nM final)	0,75 μ l
- Amorces 2 (10 μ M) (375 nM final)	0,75 μ l
- ADNc dilués au 1/30	5 μ l
- H ₂ O	QSP 20 μ l

Les conditions de PCR sont les suivantes :

10 minutes à 95°C (Activation de la Taq Hot-Start)	
30 secondes à 94°C	} 50 cycles
45 secondes à 60°C	

Pour palier au problème de liaison non spécifique du SYBR green au double brin, une courbe de fusion ou de dénaturation des produits amplifiés est réalisée de la façon suivante à l'issue de la PCR : 55°C pendant 10 secondes et ajout de 0,5°C par cycle pendant 80 cycles (de 55°C à 95°C). Quand L'ADN et le SYBR green I se séparent, on observe une chute brutale de la fluorescence. La présence d'un seul pic correspondant à la température de dénaturation des produits amplifiés, permet de confirmer la présence d'un seul amplicon.

6. Techniques de cytologie

6.1. Fixation, déshydratation et inclusion du matériel végétal

Les échantillons à analyser (feuilles, racines ou akènes) sont prélevés aux différents jours de la cinétique et fixés dans du F.A.E. (Annexe 5). La fixation dure au moins une nuit, mais les échantillons peuvent être conservés dans le F.A.E.

Les échantillons sont ensuite déshydratés progressivement dans des bains d'éthanol de concentration croissante (50% , 70%, 90% et 100%) ; chaque bain dure 20 minutes. Les fragments sont ensuite infiltrés puis inclus dans de la résine JB4 (Polysciences) selon le

protocole décrit en Annexe 14. La polymérisation est complète en 2 heures à température ambiante et sous vide.

6.2. Coupes au microtome

Les blocs de résine contenant les échantillons sont ensuite débités sur un microtome Leica R2065 de manière à obtenir des coupes transversales de 5 μm d'épaisseur. Les coupes sont déposées dans une goutte d'eau contenant de l'ammoniac sur une lame de verre. Les lames sont séchées sur une platine chauffante à 40°C.

6.3. Coloration des coupes

Les lames sont colorées par une solution aqueuse contenant du bleu de Toluidine à 0,05% (P/V). Pour cela, une goutte de colorant est déposée sur chaque coupe pendant 20 secondes. La coloration est régressée à l'eau distillée jusqu'à décoloration complète de la résine. Les lames histologiques sèches sont ensuite montées dans une résine synthétique de montage (Eukit).

6.4. Observation microscopique et photographie

Les coupes sont observées grâce à un microscope Olympus BH-2 et les photographies sont réalisées avec un appareil photographique Olympus SC35 type 12.

RESULTATS et DISCUSSION

Localisation des amorces dégénérées sur la séquence AtSTM

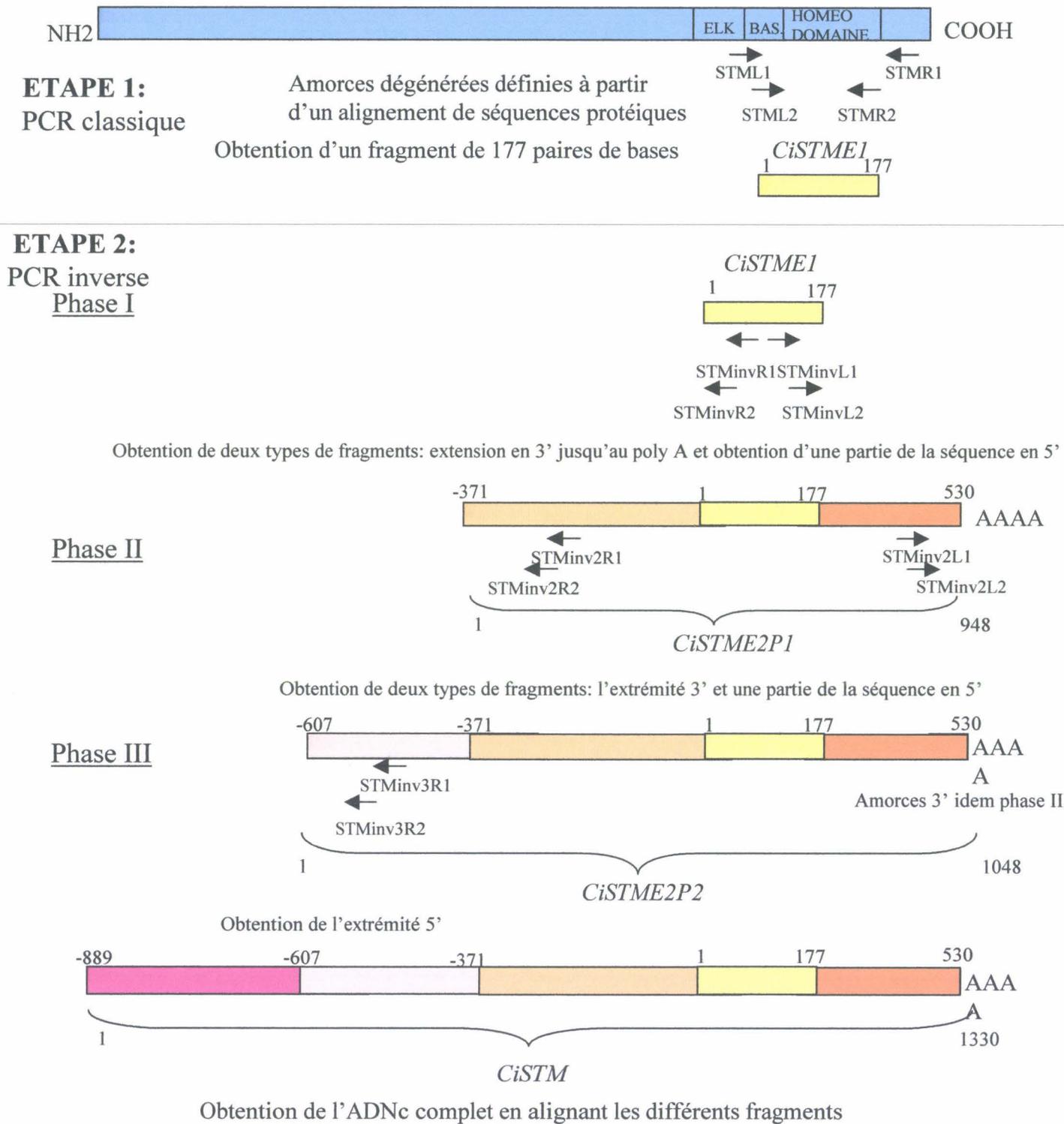


Figure 19 : Etapes menant à l'obtention de l'ADNc complet *CiSTM*.

Séquences des amorces

STML1 5'-GATATCTGGGATCTCTGAAGGAATYATGAARAA-3'
 STMinv2L2 5'-AAAGAAAGGATTTTGCATGTT-3'
 STMR1 5'-CAACAAATGCATATCTCAGAAGGYTCCARTG-3'
 STMinv2R2 5'-TCCATGAACTGATCAAGAGC-3'
 STML2 5'-GAAAGAAGGGAAAGCTGCCTAARGARGCNMG-3'
 STMinv3R1 5'-TACTTCAGGTGGTGCCCTA-3'
 STMR2 5'-GCTTCCAATGTCTCTTTCTTTGATTAATRAACCARTT-3'
 STMinv3R2 5'-AGGGTAATGGGGATGAGACA-3'
 STMinvL1 5'-TGCCTCTAGCTGAATCCACA-3'
 STMinvR1 5'-ATGGGTACGCCATTTGTAA-3'
 STMinvL2 5'-GCTGAATCCACAGGGCTAGA-3'
 STMinvR2 5'-GGTCCACCAGTCAAGCAACT-3'
 STMinv2L1 5'-CCGCAAAGAAAGGATTTTG-3'
 STMinv2R1 5'-TCACAGTAAGCTTCCATGAACTG-3'

1. Clonage des ADNc *CiSTM* et *CiCLVp*

L'objectif de cette partie du travail était de cloner et de caractériser les orthologues possibles des gènes candidats *AtSTM* et *AtCLV1* chez la chicorée. Par analogie, les gènes de chicorée seront appelés *CiSTM* et *CiCLV1p*.

L'obtention des ADNc *CiSTM** et *CiCLV1p** a nécessité plusieurs étapes de clonage qui ont permis l'alignement des séquences issues des différentes étapes d'amplification. Ces différentes étapes sont schématisées dans des figures récapitulatives du cheminement suivi pour l'obtention des ADNc. Ces figures présentent aussi les techniques et les amorces utilisées.

1.1. Clonage de *CiSTM*

Etape 1 : Clonage d'un ADNc partiel *CiSTME1*

La figure 19 présente le cheminement pour le clonage de l'ADNc *CiSTM*. La première étape a été l'utilisation d'amorces dégénérées issues d'alignements de régions hautement conservées de séquences protéiques incluant *AtSTM*. Ces amorces ont été déduites à partir de blocs de séquences grâce au logiciel CODEHOP (voir matériel et méthodes) et définies à partir de la région les plus conservées de la protéine à savoir le domaine ELK, le domaine basique, l'homéodomaine et dix acides aminés adjacents à l'homéodomaine (figure 20).

Les amorces utilisées pour l'amplification de *CiSTME1* sont STML1 et STMR1. Ce couple d'amorces a été utilisé pour une première PCR puis un second couple, STML2 et STMR2, a été utilisé pour augmenter la spécificité de l'amplification.

Les produits de seconde PCR ont été déposés sur gel d'agarose. Une bande de taille inférieure à 200 paires de base a été obtenue. La taille attendue en fonction de la localisation des amorces sur *AtSTM* est de 165 paires de base. Ce fragment a donc été cloné dans le vecteur PGEM-T easy.

* Le nom des ADNc partiels ou complets obtenus aux différentes étapes seront donnés avec les premières lettres du nom de genre et d'espèce ainsi que l'abréviation de l'étape correspondante. Exemple : *CiSTME2P1* est l'ADNc partiel de *Cichorium intybus* séquencé durant la première phase de l'étape 2 du cheminement.

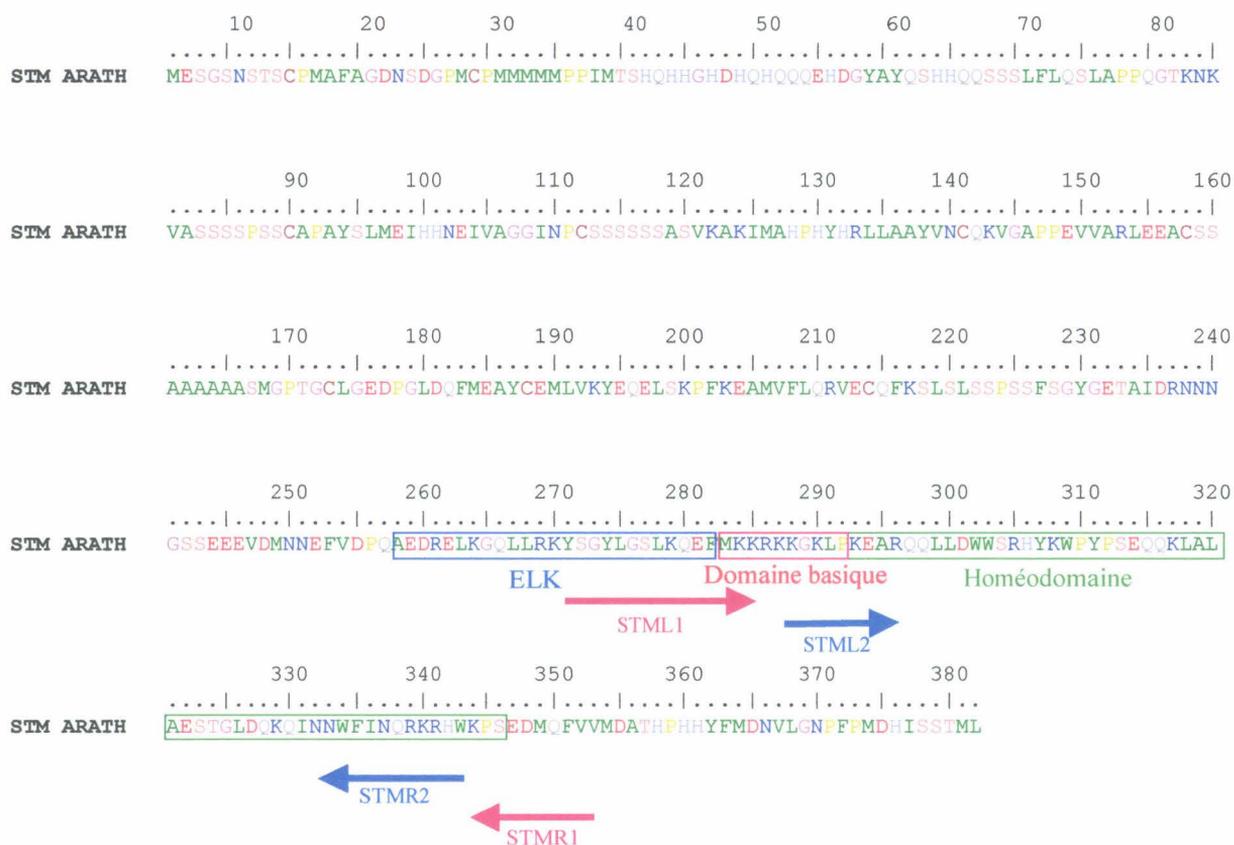


Figure 20 : Localisation des amorces dégénérées déduites à partir de la séquence protéique AtSTM.

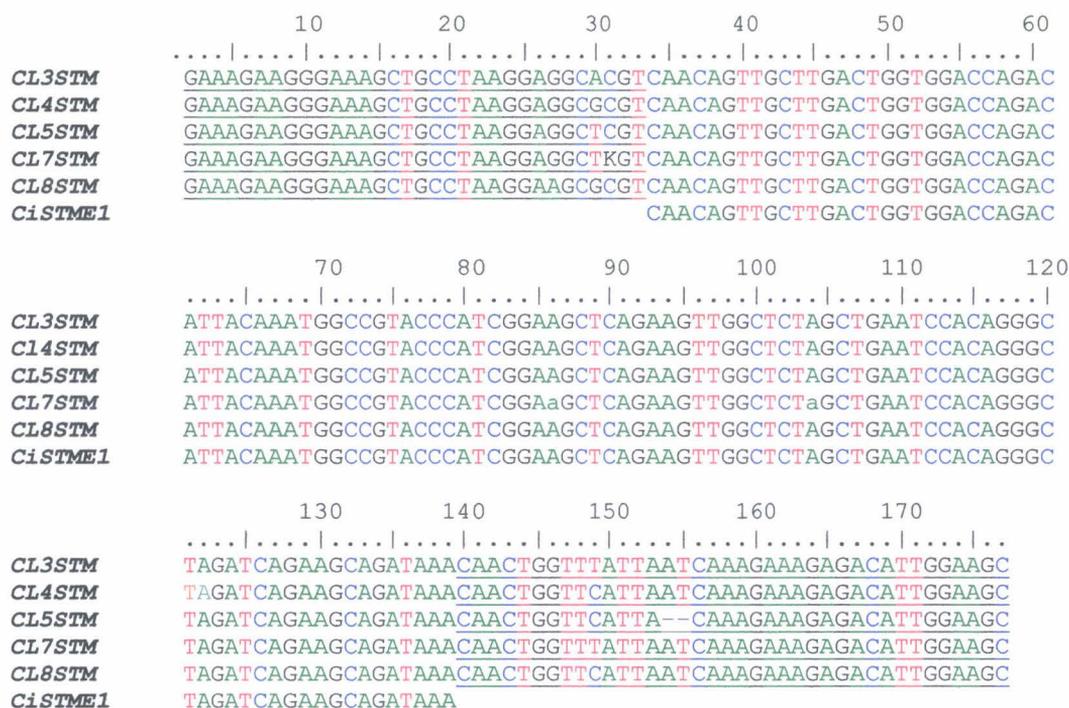


Figure 21 : Alignement des clones après l'amplification avec les amorces dégénérées et déduction d'une séquence consensus *CiSTME1*. La séquence des amorces dégénérées (soulignée) a été éliminée de ce consensus.

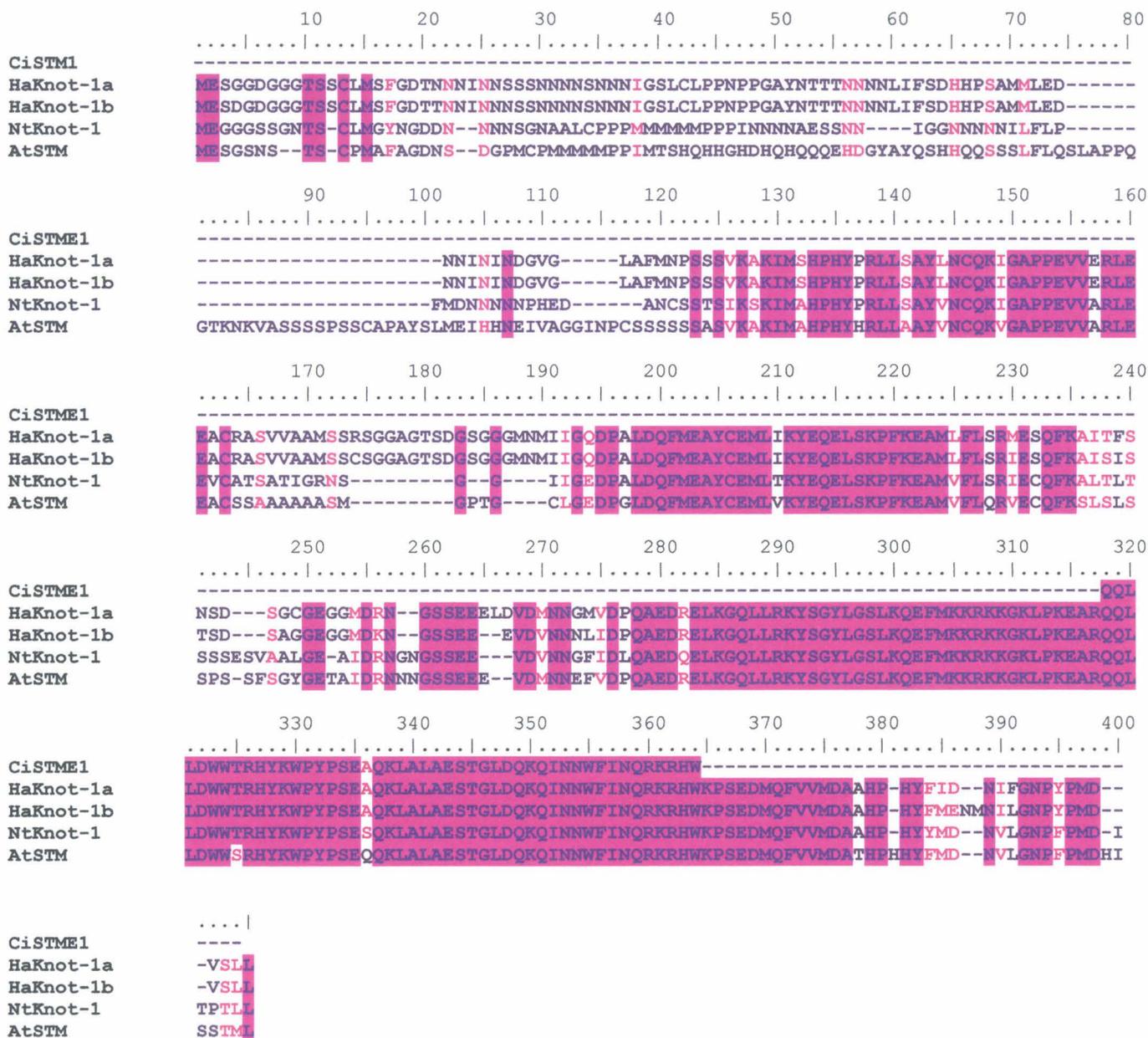


Figure 22: Alignement de la séquence protéique déduite de la séquence consensus *CiSTME1* obtenue après l'amplification avec les amorces dégénérées et les séquences de protéines de type KNOTTED-1 chez le tournesol (*Ha Knot-1a*, EMBL: AJ519674; *Ha Knot-1b*, EMBL: AY096802), le tabac (*Nt Knot-1*, EMBL: AB004785) et la séquence protéique STM d'*Arabidopsis thaliana* (*AtSTM*, EMBL: U32344).

Séquencage du fragment de l'ADNc partiel *CiSTMEL*.

Cinq clones issus de cette première étape de clonage ont été séquencés suivant la méthode de Sanger. Un alignement des séquences obtenues et la séquence consensus *CiSTMEL* déduite est proposé sur la figure 21. On observe 100% d'identité entre les différents clones ce qui suggère qu'une seule séquence a été clonée au cours de cette première étape.

La séquence a ensuite été traduite en acides aminés et la séquence protéique obtenue (*CiSTMEL*) a été soumise aux banques de données. Les homologues obtenues sont des homologues pour des protéines de type KNOTTED de classe I (KNOTTED-I) dont *AtSTM*. Les alignements de notre séquence avec les séquences qui présentent les plus fortes homologues et avec *AtSTM* sont présentés sur la figure 22. La séquence *CiSTMEL* présente respectivement dans la région commune, 100% d'identité avec deux séquences de tournesol, 98% d'identité et 100% de similitudes avec une séquence du tabac et 96% d'identité et 98% de similitudes avec la séquence protéique *AtSTM*.

Les pourcentages d'identité entre ces différentes séquences sont très élevés. En effet, la région amplifiée correspond à l'homéodomaine qui est une région très conservée au sein de la famille des protéines de type KNOTTED-I.

Etape 2 : PCR inverse

Phase I

Suite à cette première amplification, des amorces de PCR inverse ont été définies à partir de la séquence nucléotidique *CiSTMEL* (Figure 23). Ces amorces étaient destinées à amplifier les régions manquantes en 5' et 3' de la séquence partielle obtenue (Figure 19).

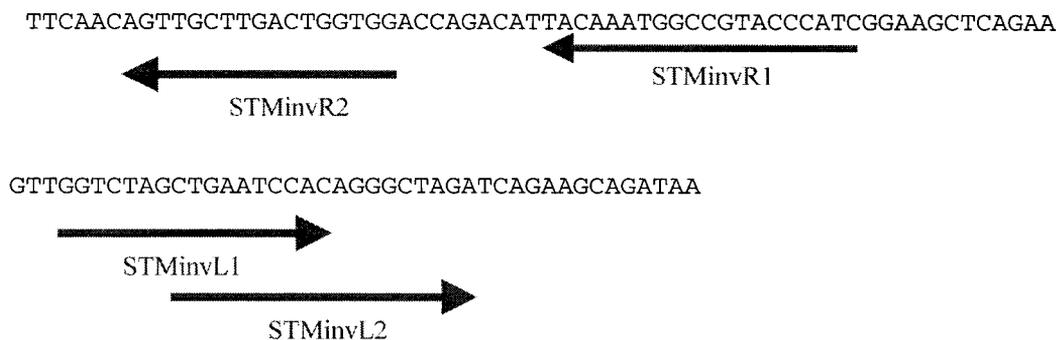


Figure 23 : Localisation des amorces de PCR inverse Phase I sur la séquence *CiSTMEL*.

Les matrices pour la PCR inverse ont été préparées à partir de 5 µg d'un mélange d'ARN totaux extraits aux différents jours de culture selon la méthode précédemment citée.

Résultats : Clonage des ADNc CiSTM et CiCLV1p

La PCR inverse a été réalisée sur plusieurs autoligatures qui diffèrent suivant l'enzyme de restriction utilisée pour la digestion des ADNc doubles brins. Les autoligatures testées sont nommées : autoligatures XhoI, KpnI, NsiI et Sall.

La première PCR est suivie d'une seconde PCR. Les produits de la première PCR ont été dilués au 1/10 pour être utilisés au cours de la seconde PCR.

Remarque : Les sites de restriction compris dans les amorces ont été choisis car ils possèdent tous des sites de reconnaissance à 6 paires de bases et la probabilité de les retrouver sur les séquences des ADNc est faible. De plus, en utilisant plusieurs autoligatures, la probabilité de cloner un ADNc pleine longueur est augmentée.

La taille attendue de l'ADNc pleine longueur se situe autour de 1200 paires de bases sans les régions UTR (UnTranslated Region). Après migration sur gel d'agarose, une bande autour de 800 paires de bases a été obtenue pour les autoligatures XhoI et Sall (Figure 24) ce qui suggère que l'ADNc complet n'a pas été amplifié. Pour les autres autoligatures, des bandes de taille inférieure à 800 paires de bases sont observées.

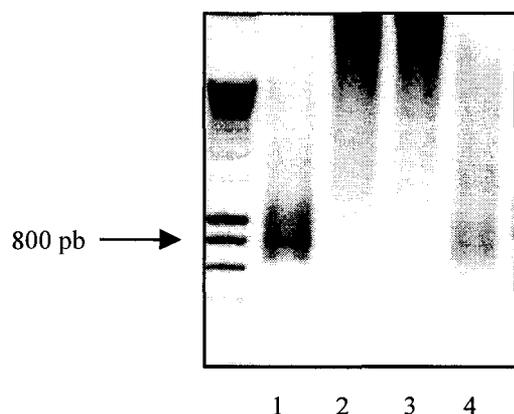


Figure 24 : Photographie du gel d'agarose après migration des produits de PCR de l'étape 2 phase I
1 : Amplification sur les autoligatures XhoI
2 : Amplification sur les autoligatures KpnI
3 : Amplification sur les autoligatures Nsi
4 : Amplification sur les autoligatures Sall

Les produits de PCR issus de l'autoligature XhoI ont donc été accumulés, clonés et séquencés. Huit clones ont été séquencés dans une direction (Annexe 15).

Les séquençages des différents clones obtenus ont permis d'établir deux groupes de séquences. Le premier groupe (3 séquences) a prolongé de 357 paires de base la séquence partielle obtenue en 5' alors que le second groupe (4 séquences) a prolongé de 353 paires de bases la séquence partielle en 3' jusqu'à l'obtention du polyA. A nouveau pour cette phase 1 étape 2, le niveau d'identité des clones entre eux est très élevé, les différences observées sont probablement dues à des erreurs de séquençage ou de lecture des séquences, voire des erreurs

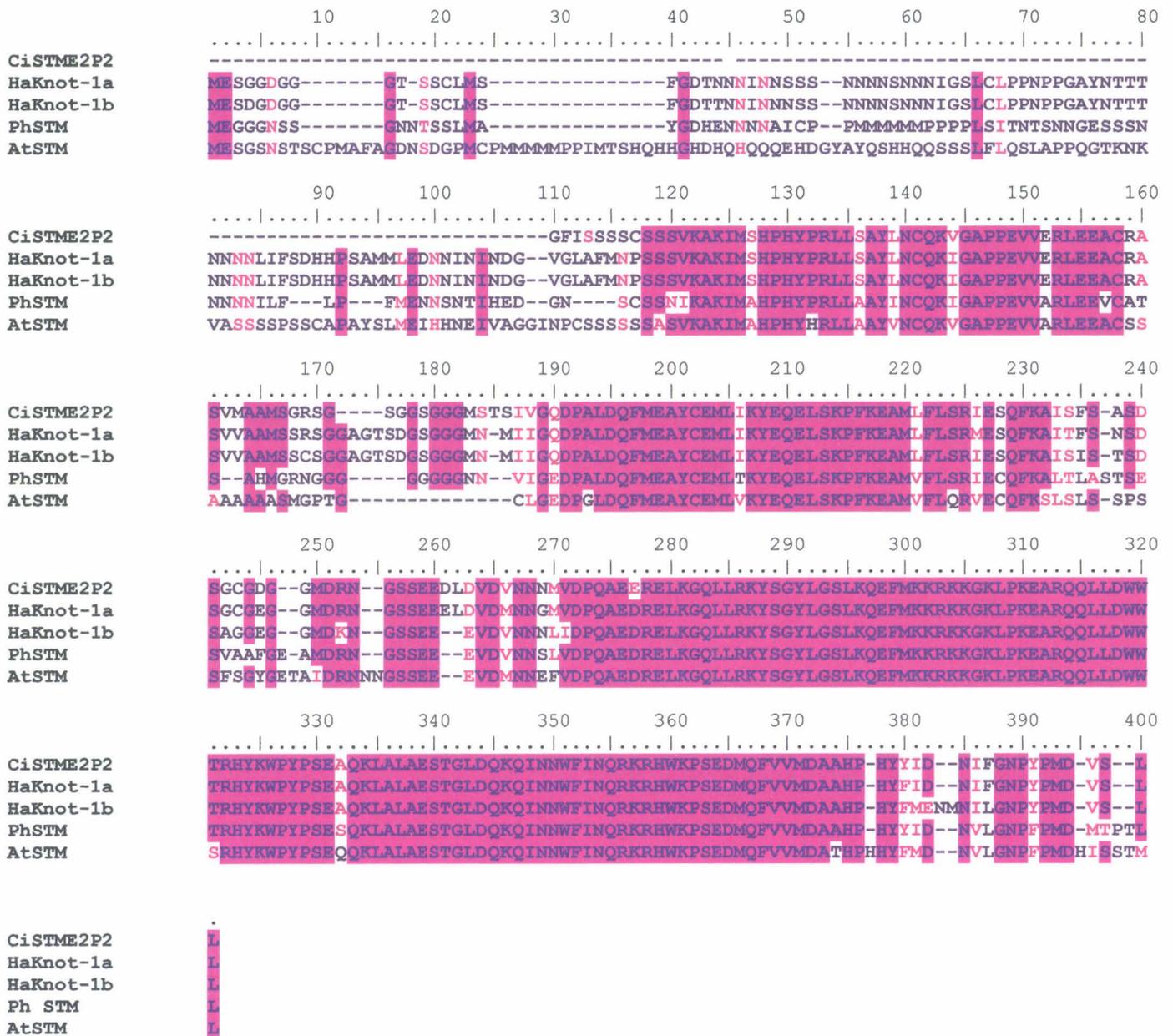


Figure 28 : Alignement de la séquence protéique déduite de la séquence consensus *CiSTME2P2* et les séquences de protéines de type KNOTTED-I chez le tournesol , (Hanot-1a, EMBL: AJ519674; Hanot-1b, EMBL: AY096802) la séquence protéique de STM chez le pétunia (PhSTM, EMBL: AY112704)et la séquence protéique STM d'*Arabidopsis thaliana* (AtSTM, EMBL: U32344).

gel d'agarose, une bande à 400 paires de bases a été obtenue pour les autoligatures KpnI (Figure 27). Ces produits ont alors été accumulés, clonés et séquencés.

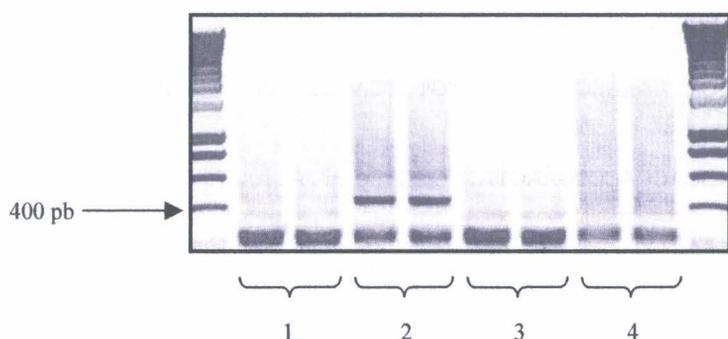


Figure 27 : Photographie du gel d'agarose après migration des produits de PCR de l'étape 2 phase II

1 : Amplification sur les autoligatures XhoI
2 : Amplification sur les autoligatures KpnI
3 : Amplification sur les autoligatures Nsi
4 : Amplification sur les autoligatures Sall
La première piste de chaque doublet représente l'amplification sur des produits de première PCR non dilués, la seconde la dilution au 1/10.

Le séquençage a été réalisé sur 11 clones et les séquences obtenues ont été alignées avec l'extrémité 5' déjà connue.

Les séquences des 11 clones obtenus sont présentées en annexe 16. La région en 5' est prolongée de 236 paires de bases. Les identités entre les clones obtenus sont à nouveau très importantes. Cependant, on peut noter quelques différences entre les clones qui sont probablement dues à des erreurs de séquençage ou à des erreurs de synthèse de la Taq polymérase. Malgré ces erreurs de séquençage, il semble qu'une seule séquence ait été clonée lors de cette phase.

De cet alignement de tous les clones, une séquence consensus a pu être définie. Ce consensus a ensuite été aligné avec la séquence *CiSTME2P1* (Annexe 17) et la séquence consensus *CiSTME2P2* a été définie.

La séquence *CiSTME2P2* a ensuite été traduite et soumise aux banques de données. Les résultats des alignements sont présentés dans la figure 28. La séquence obtenue *CiSTME2P2* est prolongée au delà des domaines conservés et les homologies les plus fortes retrouvées sont toujours pour les protéines de type KNOTTED-I qui s'alignaient le mieux à l'issue de la PCR inverse phase 1. En effet, la séquence *CiSTME2P2* présente respectivement dans la région commune 92% d'identité et 97% de similitude et 89% d'identité et 96% de similitude avec les séquences du tournesol, 79% d'identité et 91% de similitude avec la séquence STM chez le pétunia et 74% d'identité et 86% de similitudes avec la séquence protéique STM d'*Arabidopsis thaliana*. Ces résultats nous confirment que notre cheminement est correct et nous mènent à continuer dans ce sens.

GGCTTCATCTCATCGTCATCATGTTCTTCATCTGTTAAAGCGAAGATCAT**TGCTCTCATCCCCATTACCCT**CGTCTC
←
STM inv3R2

CTATCAGCTTATCTGAATTGCCAAAAGG**TAGGGGCACCACCTGAAGTA**GTGGAACGACTAGAAGAAGCTTGCCGA
←
STM inv3R1

GCGTCAGTGATGGCTGCCATGTCCGGTCGTTCCGGCTCTGGTGGCAGCGGTGGAGGTATGAGCACGAGCATTGTC
GGACAAGATCCGGCTCTTGATCAGTTCATGGAAGCTTACTGTGAAATGCTAATTAAATATGAACAAGAACTCTCA
AAACCCTTCAAGGAAGCCATGCTTTTTCTGTCAAGGATCGAGTCACAGTTCAAGGCCATCTTTTTCTGCCTCG
GATTCTGGTTGTGGGGATGGAGGCATGGATAGGAACGGGTCATCTGAAGAAGATCTGGATGTTGATGTTAATAAC
AATATGGTTGATCCTCAAGCTGAAGAGAGGGAGCTGAAAGGTCAGTTATTGCGCAAGTACAGTGGGTATTTAGGA
AGTCTGAAGCAGGAGTTTATGAAGAAGAGAAAAAAGGGAAGTTGCCCAAAGAAGCTCGTCAACAGTTGCTTGAC
TGGTGGACCAGACATTACAAATGGCCGTACCCATCGGAAGCTCAGAAGTTGGCTCTAGCTGAATCCACAGGGCTA
GATCAGAAGCAGATAAAACAACCTGGTTCATAAACCAAAGGAAGCGACACTGGAAGCCATCCGAGGATATGCAGTTT
GTGGTAATGGATGCTGCTCATCCTCACTATTATATTGACAATATCTTTGGGAACCCCTTACCCCATGGATGTGTG
CTTCTCTAGATGCATATRATGTTGGATATCATAACAACCTACCATGAAGGAATGARAGTGTATATGATCTCATCTG
AACGG**CCGCAAAGAAAGGATTTTGCATGTT**AGTGTATGCATGTTGCTGTTACCTATTATGCTTGTTTTTTRATGA
→
STM inv2L1

→
STM inv2L2

TTCTACGTTTATGTaATGTCACCTCGGAATCAGTAGTAAGTTATACATAATGTGATGTTTGATTTATATGCGAAAA
AAAA

Figure 29 : Localisation sur la séquence *CiSTME2P2* des amorces de PCR inverse utilisées lors de la phase III

Phase III

Dans l'objectif de terminer le clonage de l'ADNc pleine longueur *CiSTM*, deux amorces de PCR inverse ont été définies sur la séquence consensus *CiSTME2P2*. Ces amorces sont appelées STM inv3 R1 et STM inv3 R2. Leur localisation est proposée sur la figure 29.

Ces amorces ont été utilisées avec les amorces STM inv2 L1 et STM inv2 L2. Les amplifications ont été réalisées sur les autoligatures SallI, KpnI et XhoI.

Contrairement aux phases de PCR inverse précédentes, des mises au point ont été nécessaires pour réaliser cette amplification. La première PCR a été réalisée à une température d'hybridation de 60°C et 55°C et avec 25 cycles d'amplification. La seconde PCR a été réalisée avec 35 et 45 cycles d'amplification à la température d'hybridation de 60°C. Un second test a été réalisé avec 45 cycles et 55°C comme température d'hybridation. Les conditions de PCR à utiliser dans notre cas ont été 25 cycles à 55°C pour la première PCR et 45 cycles à 55°C pour la seconde PCR. Ces difficultés d'amplification peuvent s'expliquer par le fait que plus on s'approche de l'extrémité 5' de l'ADNc, plus l'amplification est difficile du fait de la faible représentation des ADNc pleine longueur dans la population des produits de RT. Cette faible représentation est due soit à la présence des structures secondaires, qui empêchent la transcription inverse complète des ARNm, soit à la dégradation des ARN qui se produit du côté 5'.

Une bande a environ 600 paires de bases a été obtenue avec les autoligatures SallI. Sachant qu'il manque 103 paires de bases par rapport à la séquence *AtSTM* pour cloner l'ADNc pleine longueur, en plus du 5' UTR et de la zone chevauchante de définition des amorces, ce produit pourrait correspondre à la région manquante de notre ADNc. Les produits de PCR ont été accumulés, purifiés, clonés et séquencés.

Le séquençage a été réalisé dans les deux directions sur 8 clones. Le séquençage avec l'amorce T7 a permis d'obtenir la partie manquante en 5' de l'ADNc alors que le séquençage avec l'amorce SP6 a permis de re-séquencer la région 3' UTR de l'ADNc. Les résultats des séquences du 3' UTR permettent de confirmer la séquence déjà obtenue pour cette région.

Les différents clones correspondant à la partie 5' ont été alignés entre eux et une séquence consensus *CiSTME2P3* a été définie (Annexe 18). Un alignement de l'ensemble des différentes séquences consensus est proposé sur la figure 30. Aucune différence n'est observée entre les séquences à l'issue de cet alignement, ce qui renforce l'idée qu'une seule séquence a été clonée.

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
<i>CiSTM1</i>												
<i>CiSTM2P1</i>	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----												
<i>CiSTM2P2</i>	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----												
<i>CiSTM2P3</i>	AAGTTAAGTTGAAACCCTTGGAAAGAGAAATGGATGGCGGTGGTGTAGGTACATCATGTTTGGATGGGGTTTGGAGAAAACAACAGCATTAAATCGAGGCGGTAGTAGTGATAATAATAACAGCATTGGATC												
<i>CiSTM</i>	AAGTTAAGTTGAAACCCTTGGAAAGAGAAATGGATGGCGGTGGTGTAGGTACATCATGTTTGGATGGGGTTTGGAGAAAACAACAGCATTAAATCGAGGCGGTAGTAGTGATAATAATAACAGCATTGGATC												
	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
<i>CiSTM1</i>												
<i>CiSTM2P1</i>	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----												
<i>CiSTM2P2</i>	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----												
<i>CiSTM2P3</i>	ACTGTGCTTCCCTCCACCTCCTGTTATATACAACAACANGGTAATTTTTCCACTCAGGACCATCATCATCATAGCAACTGTGGGACTTCAGCTTCTGCTACGATGCTTGAAGACAACAACAACACAGC												
<i>CiSTM</i>	ACTGTGCTTCCCTCCACCTCCTGTTATATACAACAACANGGTAATTTTTCCACTCAGGACCATCATCATCATAGCAACTGTGGGACTTCAGCTTCTGCTACGATGCTTGAAGACAACAACAACACAGC												
	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
<i>CiSTM1</i>												
<i>CiSTM2P1</i>	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----												
<i>CiSTM2P2</i>	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----												
<i>CiSTM2P3</i>	ATTAACGATGGAGGAGGCTTAGGCTTCATCTCATCGTCATCATGTTCTTTCATCTGTTAAAGCGAAGATCATGTCTCATCCCCATTACCCTCGTCTCCTATCAGCTTATCTGAATTGCCAAAAGGTAGGGG												
<i>CiSTM</i>	ATTAACGATGGAGGAGGCTTAGGCTTCATCTCATCGTCATCATGTTCTTTCATCTGTTAAAGCGAAGATCATGTCTCATCCCCATTACCCTCGTCTCCTATCAGCTTATCTGAATTGCCAAAAGGTAGGGG												
	400	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500	510	520
<i>CiSTM1</i>												
<i>CiSTM2P1</i>	CACCACCTGAAGTAGTGGAAACGACTAGAAGAAGCTTGCCGAGCGTCAGTGATGGCTGCCATGTCCGGTCTGTTCCGGCTCTGGTGGCAGCGGTGGAGGTATGAGCACGAGCATTGTCCGACAAGATCCGGC												
<i>CiSTM2P2</i>	CACCACCTGAAGTAGTGGAAACGACTAGAAGAAGCTTGCCGAGCGTCAGTGATGGCTGCCATGTCCGGTCTGTTCCGGCTCTGGTGGCAGCGGTGGAGGTATGAGCACGAGCATTGTCCGACAAGATCCGGC												
<i>CiSTM2P3</i>	CACCACCTGAAGTAGTGGAAACGACTAGAAGAAGCTTGCCGAGCGTCAGTGATGGCTGCCATGTCCGGTCTGTTCCGGCTCTGGTGGCAGCGGTGGAGGTATGAGCACGAGCATTGTCCGACAAGATCCGGC												
<i>CiSTM</i>	CACCACCTGAAGTAGTGGAAACGACTAGAAGAAGCTTGCCGAGCGTCAGTGATGGCTGCCATGTCCGGTCTGTTCCGGCTCTGGTGGCAGCGGTGGAGGTATGAGCACGAGCATTGTCCGACAAGATCCGGC												
	530	540	550	560	570	580	590	600	610	620	630	640	650
<i>CiSTM1</i>												
<i>CiSTM2P1</i>	TCTTGATCAGTTCATGGAAGCTTACTGTGAAATGCTAATTAATATGAACAAGAAGCTTCAAAACCCCTTCAAGGAAGCCATGCTTTTTCTGTCAAGGATCGAGTCACAGTTCAAGGCCATCTCTTTTTCT												
<i>CiSTM2P2</i>	TCTTGATCAGTTCATGGAAGCTTACTGTGAAATGCTAATTAATATGAACAAGAAGCTTCAAAACCCCTTCAAGGAAGCCATGCTTTTTCTGTCAAGGATCGAGTCACAGTTCAAGGCCATCTCTTTTTCT												
<i>CiSTM2P3</i>	TCTTGATCAGTTCATGGAAGCTTACTGTGAAATGCTAATTAATATGAACAAGAAGCTTCAAAACCCCTTCAAGGAAGCCATGCTTTTTCTGTCAAGGATCGAGTCACAGTTCAAGGCCATCTCTTTTTCT												
<i>CiSTM</i>	TCTTGATCAGTTCATGGAAGCTTACTGTGAAATGCTAATTAATATGAACAAGAAGCTTCAAAACCCCTTCAAGGAAGCCATGCTTTTTCTGTCAAGGATCGAGTCACAGTTCAAGGCCATCTCTTTTTCT												
	660	670	680	690	700	710	720	730	740	750	760	770	780
<i>CiSTM1</i>												
<i>CiSTM2P1</i>	GCCTCGGATTCTGGTTGTGGGGATGGAGGCATGGATAGGAACGGGTCATCTGAAGAAGATCTGGATGTTGATGTTAATAACAATATGGTTGATCCTCAAGCTGAAGAGAGGGAGCTGAAAGGTCAGTTAT												
<i>CiSTM2P2</i>	GCCTCGGATTCTGGTTGTGGGGATGGAGGCATGGATAGGAACGGGTCATCTGAAGAAGATCTGGATGTTGATGTTAATAACAATATGGTTGATCCTCAAGCTGAAGAGAGGGAGCTGAAAGGTCAGTTAT												
<i>CiSTM2P3</i>	GCCTCGGATTCTGGTTGTGGGGATGGAGGCATGGATAGGAACGGGTCATCTGAAGAAGATCTGGATGTTGATGTTAATAACAATATGGTTGATCCTCAAGCTGAAGAGAGGGAGCTGAAAGGTCAGTTAT												
<i>CiSTM</i>	GCCTCGGATTCTGGTTGTGGGGATGGAGGCATGGATAGGAACGGGTCATCTGAAGAAGATCTGGATGTTGATGTTAATAACAATATGGTTGATCCTCAAGCTGAAGAGAGGGAGCTGAAAGGTCAGTTAT												
	790	800	810	820	830	840	850	860	870	880	890	900	910
<i>CiSTM1</i>												
<i>CiSTM2P1</i>	TGCACAAGTACAGTGGGTATTTAGGAAGCTGAAGCAGGAGTTTATGAAGAAGAGAAAAAAGGGAAGTTGCCCAAAGAAGCTCGTCAACAGTTGCTTGACTGGTGGACCAGACATTACAAATGGCCGTA												
<i>CiSTM2P2</i>	TGCACAAGTACAGTGGGTATTTAGGAAGCTGAAGCAGGAGTTTATGAAGAAGAGAAAAAAGGGAAGTTGCCCAAAGAAGCTCGTCAACAGTTGCTTGACTGGTGGACCAGACATTACAAATGGCCGTA												
<i>CiSTM2P3</i>	TGCACAAGTACAGTGGGTATTTAGGAAGCTGAAGCAGGAGTTTATGAAGAAGAGAAAAAAGGGAAGTTGCCCAAAGAAGCTCGTCAACAGTTGCTTGACTGGTGGACCAGACATTACAAATGGCCGTA												
<i>CiSTM</i>	TGCACAAGTACAGTGGGTATTTAGGAAGCTGAAGCAGGAGTTTATGAAGAAGAGAAAAAAGGGAAGTTGCCCAAAGAAGCTCGTCAACAGTTGCTTGACTGGTGGACCAGACATTACAAATGGCCGTA												

```

          920      930      940      950      960      970      980      990      1000      1010      1020      1030      1040
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CiSTM1      CCCATCGGAAGCTCAGAAGTTGGCTCTAGCTGAATCCACAGGGCTAGATCAGAAGCAGATAAAC
CiSTM2P1    CCCATCGGAAGCTCAGAAGTTGGCTCTAGCTGAATCCACAGGGCTAGATCAGAAGCAGATAAACAACTGGTTCATAAACCAAGGAAGCGACACTGGAAGCCATCCGAGGATATGCAGTTTGTGGTAATG
CiSTM2P2    CCCATCGGAAGCTCAGAAGTTGGCTCTAGCTGAATCCACAGGGCTAGATCAGAAGCAGATAAACAACTGGTTCATAAACCAAGGAAGCGACACTGGAAGCCATCCGAGGATATGCAGTTTGTGGTAATG
CiSTM2P3    CCCATCGGAAGCTCAGAAGTTGGCTCTAGCTGAATCCACAGGGCTAGATCAGAAGCAGATAAACAACTGGTTCATAAACCAAGGAAGCGACACTGGAAGCCATCCGAGGATATGCAGTTTGTGGTAATG
CiSTM      CCCATCGGAAGCTCAGAAGTTGGCTCTAGCTGAATCCACAGGGCTAGATCAGAAGCAGATAAACAACTGGTTCATAAACCAAGGAAGCGACACTGGAAGCCATCCGAGGATATGCAGTTTGTGGTAATG

          1050      1060      1070      1080      1090      1100      1110      1120      1130      1140      1150      1160      1170
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CiSTM1
CiSTM2P1    GATGCTGCTCATCCTCACTATTATATTGACAATATCTTTGGGAACCCTTACCCCATGGATGTGTCGCTTCTCTAGATGCATATRATGTTGGATATCATAACAACCTACCATGAAGGAATGARAGTGTATAT
CiSTM2P2    GATGCTGCTCATCCTCACTATTATATTGACAATATCTTTGGGAACCCTTACCCCATGGATGTGTCGCTTCTCTAGATGCATATRATGTTGGATATCATAACAACCTACCATGAAGGAATGARAGTGTATAT
CiSTM2P3    GATGCTGCTCATCCTCACTATTATATTGACAATATCTTTGGGAACCCTTACCCCATGGATGTGTCGCTTCTCTAGATGCATATRATGTTGGATATCATAACAACCTACCATGAAGGAATGARAGTGTATAT
CiSTM      GATGCTGCTCATCCTCACTATTATATTGACAATATCTTTGGGAACCCTTACCCCATGGATGTGTCGCTTCTCTAGATGCATATRATGTTGGATATCATAACAACCTACCATGAAGGAATGARAGTGTATAT

          1180      1190      1200      1210      1220      1230      1240      1250      1260      1270      1280      1290      1300
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CiSTM1
CiSTM2P1    GATCTCATCTGAACGGCCGCAAAGAAAGGATTTGCATGTTAGTGTATGCATGTTGCTGTTACCTATTATGCTTGTGTTTTTRATGATTCTACGTTTATGTaATGTCACCTCGGAATCAGTAGTAAGTTATA
CiSTM2P2    GATCTCATCTGAACGGCCGCAAAGAAAGGATTTGCATGTTAGTGTATGCATGTTGCTGTTACCTATTATGCTTGTGTTTTTRATGATTCTACGTTTATGTaATGTCACCTCGGAATCAGTAGTAAGTTATA
CiSTM2P3    GATCTCATCTGAACGGCCGCAAAGAAAGGATTTGCATGTTAGTGTATGCATGTTGCTGTTACCTATTATGCTTGTGTTTTTRATGATTCTACGTTTATGTaATGTCACCTCGGAATCAGTAGTAAGTTATA
CiSTM      GATCTCATCTGAACGGCCGCAAAGAAAGGATTTGCATGTTAGTGTATGCATGTTGCTGTTACCTATTATGCTTGTGTTTTTRATGATTCTACGTTTATGTaATGTCACCTCGGAATCAGTAGTAAGTTATA

          1310      1320      1330
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CiSTM1
CiSTM2P1    CATAATGTGATGTTTGATTATATGCG
CiSTM2P2    CATAATGTGATGTTTGATTATATGCGAAAAAAAAA
CiSTM2P3    CATAATGTGATGTTTGATTATATGCGAAAAAAAAA
CiSTM      CATAATGTGATGTTTGATTATATGCGAAAAAAAAA

```

Figure 30 : Alignement des séquences consensus définies aux différentes étapes du clonage et déduction de la séquence *CiSTM*.

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90      100     110     120     130     140     150
CiSTM AAGTTAAGTTGAAACCCTTGGAAAGAGAAATGGATGGCGGTGGTGTAGGTACATCATGTTTGATGGGGTTTGGAGAAAACACAGCATTAATCGAGGCGGTAGTAGTGATAAATAAACAACAGCATTGGATCACTGTCTTCCCTCCACCTC
      M D G G G V G T S C L M G F G E N N S I N R G G S S D N N N S I G S L C L P P P
      160     170     180     190     200     210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
CiSTM CTGTATATACAACAACANGGTAATTTTTTCCACTCAGGACCATCATCATCATAGCAACTGTGGGACTTCAGCTTCTGCTACGATGCTTGAAGACAACAACAACAGCATTAAACGATGGAGGAGGCTTAGGCTTCATCTCATCGTCAT
      P V I Y N N X V I F S T Q D H H H H S N C G T S A S A T M L E D N N N N S I N D G G G L G F I S S S
      310     320     330     340     350     360     370     380     390     400     410     420     430     440     450
CiSTM CATGTTCTTCATCTGTTAAAGCGAAGATCATGTCTCATCCCCATTACCTCGTCTCCTATCAGCTTATCTGAATTGCCAAAAGGTAGGGGACCCACCTGAAGTAGTGAACGACTAGAAGAAGCTTGCCGAGCGTCAGTGATGGCTGCCA
      S C S S S V K A K I M S H P H Y P R L L S A Y L N C Q K V G A P P E V V E R L E E A C R A S V M A A
      460     470     480     490     500     510     520     530     540     550     560     570     580     590     600
CiSTM TGTCCGGTCGTTCCGGCTCTGGTGGCAGCGGTGGAGGTATGAGCAGCAGCATTGTCGGACAAGATCCGGCTCTTGATCAGTTCATGGAAGCTTACTGTGAATGCTAATTTAAATATGAACAAGAAGCTCTCAAACCCCTTCAAGGAAGCCA
      M S G R S G S G G S G G G M S T S I V G Q D P A L D Q F M E A Y C E M L I K Y E Q E L S K P F K E A
      610     620     630     640     650     660     670     680     690     700     710     720     730     740     750
CiSTM TGCTTTTCTGTCAAGGATCGAGTCACAGTTCGAAGGCCATCTCTTTTTCTGCCTCGGATTCGGTTGTGGGGATGGAGGCATGGATAGGAACGGGTCATCTGAAGAAGATCTGGATGTTGATGTTAATAACAATATGGTTGATCCTCAAG
      M L F L S R I E S Q F K A I S F S A S D S G C G D G G M D R N G S S E E D L D V D V N N N M V D P Q
      760     770     780     790     800     810     820     830     840     850     860     870     880     890     900
CiSTM CTGAAGAGAGGGAGCTGAAAGGTCAGTTATTGCGCAAGTACAGTGGGTATTTAGGAAGTCTGAAGCAGGAGTTTATGAAGAAGAGAAAAAAGGGAAGTTGCCAAAGAAGCTCGTCAACAGTTGCTTACTGGTGGACCAGACATTACA
      A E E R E L K G Q L L R K Y S G Y L G S L K Q E F M K K R K K G K L P K E A R Q Q L L D W W T R H Y
      910     920     930     940     950     960     970     980     990     1000    1010    1020    1030    1040    1050
CiSTM AATGGCCGTACCCATCGGAAGCTCAGAAGTTGGCTCTAGCTGAATCCACAGGGCTAGATCAGAAGCAGATAAACCAACTGGTTCATAAACCCAAAGGAAGCGACACTGGAAGCCATCCGAGGATATGCAGTTTGTGGTAATGGATGCTGCTC
      K W P Y P S E A Q K L A L A E S T G L D Q K Q I N N W F I N Q R K R H W K P S E D M Q F V V M D A A
      1060    1070    1080    1090    1100    1110    1120    1130    1140    1150    1160    1170    1180    1190    1200
CiSTM ATCCTCACATTTATATTGACAAATCTTTGGGAACCCTTACCCCATGGATGTCGCTTCTCTAGATGCATATRATGTTGGATATCATAACCACTACCATGAAGGAATGARAGTGATATGATCTCATCTGAACGGCCGCAAAAGAAAGG
      H P H Y Y I D N I F G N P Y P M D V S L L *
      1210    1220    1230    1240    1250    1260    1270    1280    1290    1300    1310    1320    1330
CiSTM ATTTTGCATGTTAGTGTATGCATGTTGCTGTTACCTATATGCTTGTGTTTTRATGATTCACGTTTATGTAATGTCACCTCGGAATCAGTAGTAAGTTATACATAAATGTGATGTTTGATTTATATGCCAAAAA

```

Figure 31 : Séquence *CiSTM* complète et déduction de la séquence protéique correspondante (CiSTM).

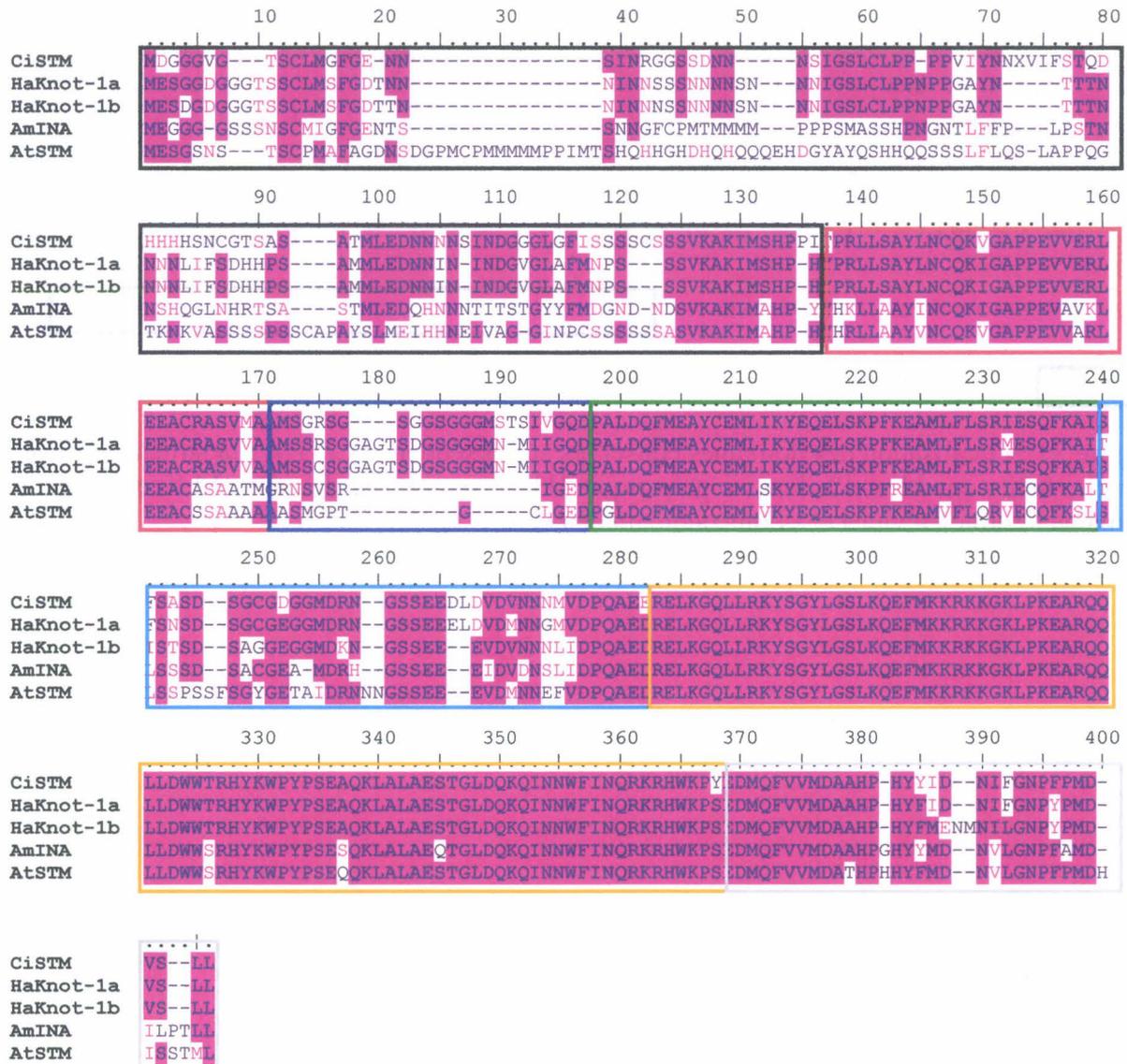


Figure 32 : Alignement de la séquence protéique déduite de la séquence consensus *CiSTM* et les séquences de protéines de type KNOTTED-I chez le tournesol (HaKnot-1a, EMBL: AJ519674; HaKnot-1b, EMBL: AY096802), la séquence protéique de *INVAGINATA* chez *Anthirrinum majus* (AmIna, EMBL: AY072735) et la séquence protéique STM d'*Arabidopsis thaliana* (AtSTM, EMBL: U32344).

Les régions conservées pour l'analyse phylogénétique sont représentées en rouge pour le domaine hélice, boucle, hélice, en vert pour le domaine hélice H3, et en orange pour le domaine ELK et l'homéodomaine. Les régions exclues de l'analyse sont la région N-terminale en noir, la séquence jonction L1 en bleu, la séquence jonction L2 en turquoise et la région C-terminale en gris.

MDGGG VGTSCLMGFGENN SINRGGSSDNNN SIGSLCLPPP VI YNNXVI FSTQDHHHH SNCGTSASATMLEDNNNN SIN
 DGGG LGFISSSS CSSS VKAKIMSEPHYPRLL SAYLNCQKVGAPPEVVERLEEACRASVMAAM SGRSGSGGSGGG MSTSI
 VGGDIPALDQFMEAYCEMLI KYEQELSKPFKEAML FLSRIESQFKAI SFSASDSGCGDGGMDRNGSS EED LDVDVNNN MV
 DPQAEERELKGQLLRKYSGYLGSLKQETMKKRKKGKL KEARQQLLDWWTRHYKWYPSEAQKLALA ESTGLDQKQINN
 WFINQRKRHWK SEDMQFVVM DAAHPHYIDNIFGNPYPMDVSL

Figure 33 : Localisation des domaines conservés sur la séquence CiSTM : la structure hélice, boucle, hélice en bleu, l'hélice amphipatique H3 en orange, le domaine ELK en rose, le domaine basique en violet et l'homéodomaine en vert.

Résultats : Clonage des ADNc CiSTM et CiCLV1p

Cette séquence a ensuite été traduite (Figure 31). Ce dernier séquençage a permis d'obtenir la séquence complète et une partie de la région 5' UTR. Cette séquence possède 1340 paires de bases, l'UTR en 5' a été séquençé sur 29 paires de bases, suggérant qu'il est incomplet, l'UTR en 3' a été séquençé sur 226 paires de bases qui précèdent la queue polyA. La séquence codante la plus probable, déduite après traduction, contient donc 1081 paires de bases soit 361 acides aminés.

Après traduction, la séquence complète a été soumise aux banques de données. Les résultats des alignements sont proposés sur la figure 32 et montrent que les homologues de notre séquence sont les plus fortes pour deux protéines de type KNOTTED-I séquencées chez le tournesol. En effet, CiSTM présente respectivement 79% d'identité et 89% de similitude et 76% d'identité et 87% de similitude avec les séquences du tournesol. Ce résultat n'est pas surprenant puisque le tournesol et la chicorée appartiennent tous les deux à la famille des Astéracées.

Si l'on regarde les résultats des alignements avec d'autres espèces dont *Arabidopsis* et *Anthirrinum majus*, on remarque que les homologues sont moins importantes. En effet, CiSTM présente 60% d'identité et 77% de similitude avec la séquence de INVAGINATA de *Anthirrinum majus* et 57% d'identité et 73% de similitude avec la séquence AtSTM.

1.2. Analyse de la séquence protéique déduite CiSTM

La première étape dans l'analyse de la séquence a été la recherche de domaines conservés grâce au logiciel Pfam (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/>). Les différents domaines identifiés sur notre séquence sont présentés sur la figure 33. Les domaines caractéristiques sont donc parfaitement reconnaissables et positionnés sur notre séquence. En effet, la séquence CiSTM possède un domaine hélice, boucle, hélice, un domaine hélice amphipatique H3, un domaine ELK et un homéodomaine, caractéristiques des protéines de type KNOTTED.

Dans le but de positionner notre séquence protéique CiSTM parmi les séquences de type KNOTTED, une approche phylogénétique a été envisagée. Le problème qui se posait alors a été le faible pourcentage de conservation dans certaines régions des séquences de type KNOTTED. Dans leur étude de phylogénie, Bharathan *et al.* (1999) ont réalisé des alignements des séquences protéique de protéines de type KNOTTED en excluant les séquences jonctions L1 et L2 ainsi que les extrémités N- et C- terminales, les séquences de ces régions étant trop peu conservées. Leur classement des protéines KNOTTED ne s'est fait

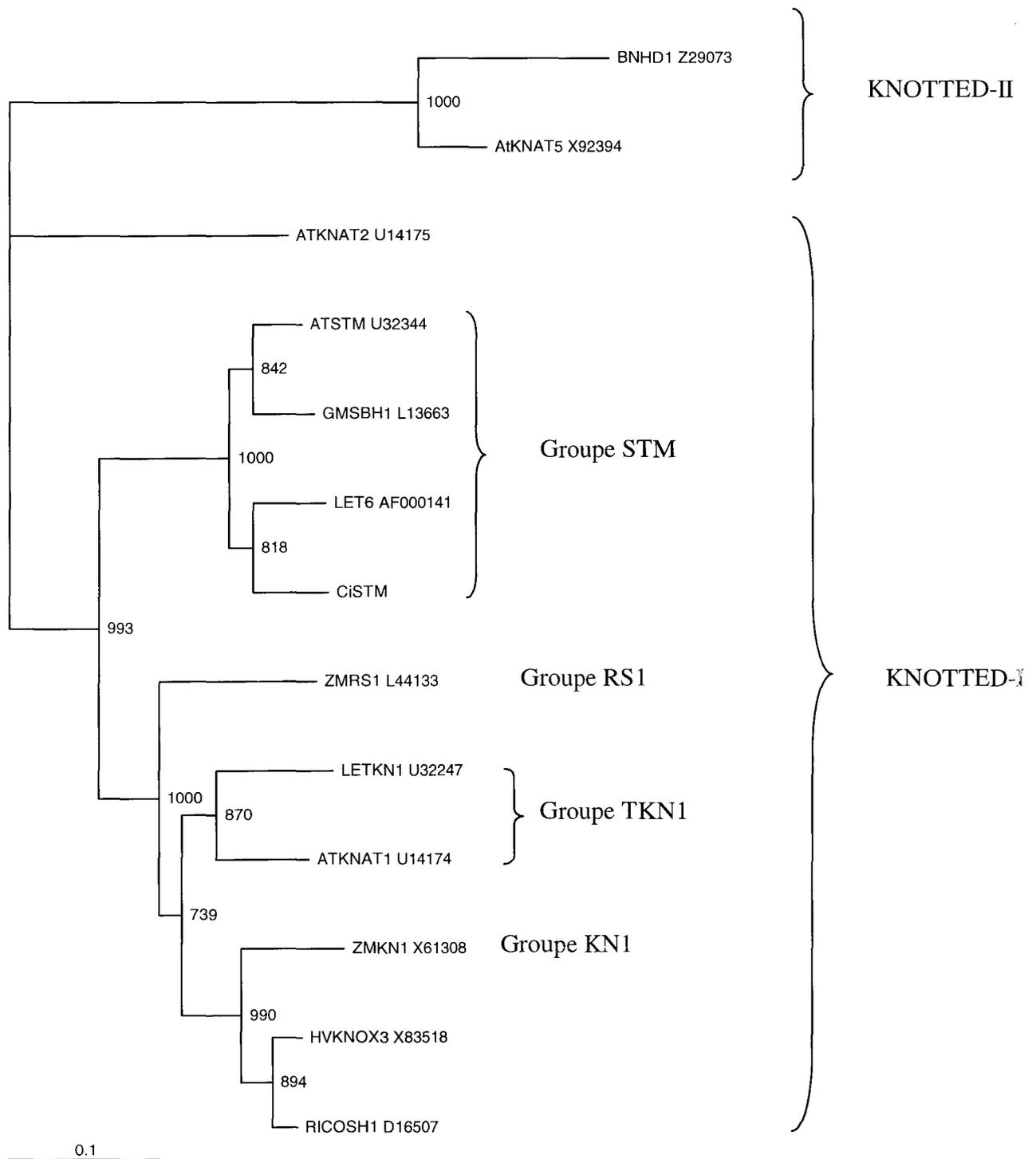


Figure 34 : Analyse phylogénétique de séquences protéiques de type KNOTTED-I et KNOTTED-II. Les séquences protéiques des domaines conservés des protéines KNOTTED ont été utilisées pour l'alignement et la construction de l'arbre. Les préfixes des noms de séquences correspondent aux noms de genre et d'espèce : AT : *Arabidopsis thaliana*, BN : *Brassica napus*, GM : *Glycine max*, LE : *Lycopersicon esculentum*, Ci : *Cichorium intybus*, ZM : *Zea mays*, Hv : *Hordeum vulgare*, OS : *Oryza sativa*.

qu'à partir des homologies entre les domaines structure hélice, boucle, hélice, hélice amphipatique H3 et les domaines ELK et homéodomaine. Ces régions sont présentes dans toutes les séquences des protéines de type KNOTTED et ont pour cette raison été utilisées pour établir une classification des protéines de type KNOTTED (Bharathan et al., 1999). Ces différentes régions ont été localisées sur un alignement de séquences homologues à CiSTM (Figure 32).

Pour réaliser une étude de phylogénie, nous avons aligné des séquences protéiques de type KNOTTED et les régions N-terminales, les séquences jonction L1 et L2 et les régions C-terminales ont été éliminées. Les séquences choisies représentent tous les groupes de KNOTTED-I et un groupe de KNOTTED-II. L'arbre phylogénétique a été réalisé avec le logiciel ClustalX et est présenté sur la figure 34. Cet arbre permet de rattacher la séquence CiSTM aux séquences de type KNOTTED-I et en particulier au groupe STM de façon très robuste. En effet, nous retrouvons dans ce groupe trois autres séquences du groupe STM : AtSTM, GMSHB1 et LTE6.

Pour préciser les résultats obtenus à l'issue de l'analyse phylogénétique, il nous a semblé important de vérifier l'appartenance de notre séquence CiSTM au groupe STM en s'attardant sur la structure des motifs conservés des séquences du groupe STM.

Une première discrimination possible a consisté en l'alignement des structures hélice, boucle, hélice de séquence de type KNOTTED I et II (Figure 35). Au sein de la structure hélice boucle, hélice, il existe des différences de nombre d'acides aminés entre les deux groupes. Ce premier critère permet de discriminer les protéines de type KNOTTED-I et KNOTTED-II.

La proline figurée en rouge est un acide commun à toutes les séquence KNOTTED. Ce premier alignement indique que la séquence CiSTM appartient au groupe des protéines KNOTTED-I.

Les alignements des blocs de la séquence CiSTM avec les blocs conservés des séquences du groupe STM et du groupe le plus proche TKN1 sont proposés sur la figure 36 (Bharathan *et al.*, 1999).

Sur l'ensemble des domaines hélice, boucle, hélice, hélice amphipatique H3, ELK et homéodomaine, les acides aminés conservés entre les séquences du groupe STM, auquel a été ajoutée la séquence CiSTM représentent 64 % des acides aminés. On peut noter que 30% des acides aminés non homologues ne le sont initialement pas entre les séquence du groupe STM.

Structure hélice, boucle, hélice

KNOTTED-II	{	AT KNAT3	YEQLLSAHVACLRIATPVDQLP.RIDAQLAQSQHVVAKY
		OS H45	YEQLLSAHVACLRIATPVDQLP.RIDAQLAQSQGVVAKY
KNOTTED-I	{	AtSTM	YHRLLAAYVNCQKVGGA.....PPEVVARLEEACSSAAAA
		LET6	YHRLLTAYLNCQKIGA.....PPEVVARLEEICATSATM
		CiSTM	YPRLLSAYLNCQKVGGA.....PPEVVERLEEACRASVMA

Figure 35 : Alignement de séquences de type KNOTTED-I et KNOTTED-II au niveau de la structure hélice, boucle, hélice

Structure hélice, boucle, hélice

Groupe STM	{	LET6	YHRLLTAYLNCQKIGAPPEVVARLEEICATSATM
		AtSTM	YHRLLAAYVNCQKVGAPPEVVARLEEACSSAAAA
		GMSBH1	YHRLLAAYVNCQKVGAPPEVVARLEEACASAATM
		CiSTM	YPRLLSAYLNCQKVGAPPEVVERLEEACRASVMA
Groupe TKN1	{	LE TKN1	CSNLLDAYMDCQKVGAPPEVVARLEEICATSATMG
		AT KNAT1	YSTLLQAYLDCQKIGAPPDVVDRIITAARQDFEARQ

Hélice amphipatique H3

Groupe STM	{	LET6	ALDQFMEAYCEMLTKYEQELSKPFKEAMVFLSRIECQFKAL
		AtSTM	GLDQFMEAYCEMLVKYEQELSKPFKEAMVFLQRVECQFKSL
		GMSBH1	ALDQFMEAYCEMLTKYEQELSKPLKEAMLFLQRIECQFKNL
		CiSTM	ALDQFMEAYCEMLIKYEQELSKPFKEAMLFLSRIESQFKAI
Groupe TKN1	{	LE TKN1	ELDQFMEAYYDMLVKYREELTRPLQEAMEFMQKIEAQLNML
		AT KNAT1	ELDQFMEAYCDMLVKYREELTRPIQEAMEFIRRIESQLSML

Domaine ELK

Groupe STM	{	LET6	RELKGQLLRKYSGYLGSLKQEFM
		AtSTM	RELKGQLLRKYSGYLGSLKQEFM
		GMSBH1	RDLDKGQLLRKYSGYLGSLKQEFM
		CiSTM	RELKGQLLRKYSGYLGSLKQEFM
Groupe TKN1	{	LE TKN1	RELKNHLLRKYSGYLSSLKQELS
		AT KNAT1	RELKNHLLKKYSGYLSSLKQELS

Homéodomaine

Groupe STM	{	LET6	KKRKKGKLPKEARQQLVDWWLRHIKWPYPSESQKLALAESTGLDQKQINNWFINQRKRHWKPS
		AtSTM	KKRKKGKLPKEARQQLLDWWSRHYKWPYPSEQQKLALAESTGLDQKQINNWFINQRKRHWKPS
		GMSBH1	KKRKKGKLPKEARQQLLEWWRHYKWPYPSESQKLALAESTGLDQKQINNWFINQRKRHWKPS
		CiSTM	KKRKKGKLPKEARQQLLDWWRHYKWPYPSEAAQKLALAESTGLDQKQINNWFINQRKRHWKPS
Groupe TKN	{	LE TKN1	KKKKKGKLPKDARQKLLITWWELHYKWPYPSESEKVALAESTGLDQKQINNWFINQRKRHWKPS
		AT KNAT1	KKKKKGKLPKEARQKLLITWWELHYKWPYPSESEKVALAESTGLDQKQINNWFINQRKRHWKPS

Figure 36 : Alignement des domaines conservés de CiSTM avec ceux des protéines des groupes STM et TKN

Les acides aminés identiques au sein du groupe STM sont représentés en bleu. Les régions communes à trois séquences dont CiSTM sont représentés en rouge et les acides aminés communs à trois séquences dont CiSTM sont figurés en vert. Les acides aminés conservés entre les séquences de groupe TKN sont figurés en violet.

Résultats : Clonage des ADNc *CiSTM* et *CiCLV1p*

Ces acides aminés sont donc variables dans les séquences du groupe STM. Pour la structure en hélice H3, 73% des acides aminés sont conservés entre les quatre séquences. Parmi les 11 acides aminés qui ne sont pas communs aux quatre séquences, une séquence de trois acides aminés est retrouvée dans trois séquences dont *CiSTM*. Le domaine ELK présente 95% d'acides aminés identiques entre le groupe STM et la séquence *CiSTM*. L'acide aminé différent dans les quatre séquences est commun à trois séquences dont *CiSTM*. De même, 95% des acides aminés de l'homéodomaine sont identiques. Deux acides aminés parmi les trois non conservés sont différents entre les trois séquences du groupe STM. Enfin, pour confirmer l'hypothèse de l'appartenance de la séquence *CiSTM* au groupe STM, il a été possible de repérer des séquences de quelques acides aminés caractéristiques du groupe STM pour les structures hélice, boucle hélice et l'hélice amphipatique.

Le groupe le plus proche de STM est le groupe TKN1 dans lequel on retrouve les séquences protéiques *LeTKN1* et *AtKNAT1*. *CiSTM* présente 40% d'homologies avec les séquences du groupe TKN1 dans la région hélice, boucle, hélice. Au niveau de l'hélice H3, les homologies entre les trois séquences (*CiSTM*, *LeTKN1* et *AtKNAT1*) sont de 43%. Les homologies au niveau du domaine ELK sont de 78%. Enfin, 82% des acides aminés de l'homéodomaine sont identiques. Les homologies pour les quatre régions sont moins fortes qu'à l'intérieur du groupe STM. Ce résultat n'est pas surprenant pour les deux premières régions puisqu'elles sont moins bien conservées entre les groupes. Par contre le domaine ELK et l'homéodomaine sont assez bien conservés au sein des protéines de type KNOTTED.

Ces résultats confirment ainsi l'appartenance de *CiSTM* au groupe STM et suggère que *CiSTM* est un gène orthologue de *AtSTM*.

L'étude de l'expression spatio-temporelle de *CiSTM* et la comparaison avec le profil d'expression de *AtSTM* apportera des éléments supplémentaires pour statuer sur l'équivalence fonctionnelle entre *AtSTM* et *CiSTM*.

Localisation des amorces dégénérées sur la séquence CLV1 d'*Arabidopsis thaliana*



ETAPE 1:
PCR classique

Amorces dégénérées définies à partir d'un alignement de séquences protéiques

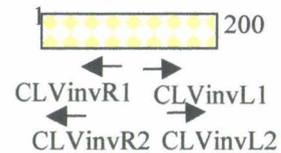


Obtention d'un fragment d'environ 200 paires de bases

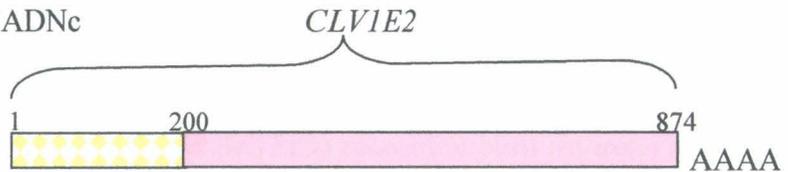


ETAPE 2:

PCR inverse



Obtention de l'extrémité 3' de l'ADNc



ETAPE 3:

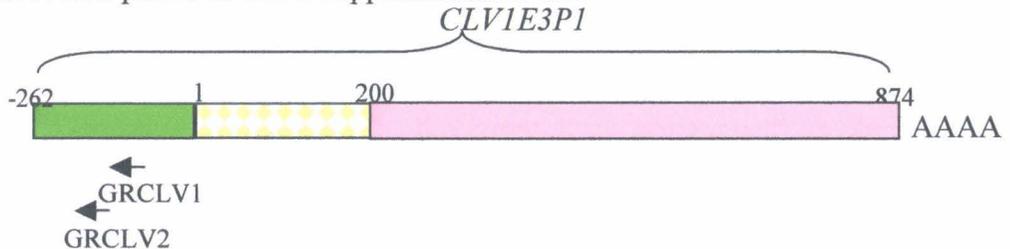
5' RACE
PCR



RT spécifique et 5' RACE PCR

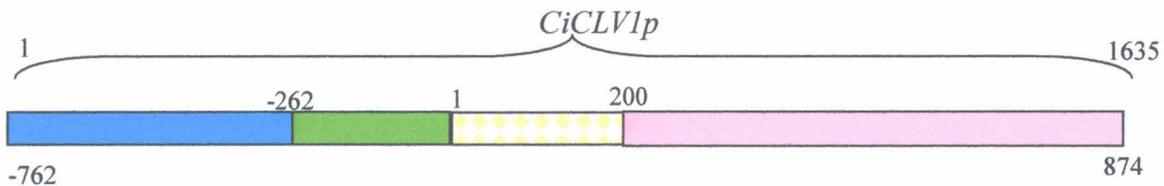
Méthode classique

Obtention de 262 paires de bases supplémentaires en 5'



Utilisation du kit « Gene Racer »

Obtention de 500 paires de bases supplémentaires en 5' : obtention d'une séquence partielle de 1635 paires de bases



1.3. Clonage de *CiCLV1p*

La figure 37 présente le cheminement et l'ensemble des amorces utilisées pour le clonage de l'ADNc *CiCLV1p*. Le cheminement suivi pour le clonage de *CiCLV1p* est plus complexe que pour le clonage de *CiSTM*. En effet, l'ADNc complet *AtCLV1* possède 2943 paires de bases.

Etape 1 : Obtention de l'ADNc partiel *CiCLV1E1*.

De même que pour l'amplification partielle de *CiSTM*, des amorces dégénérées ont été déduites à partir d'alignements de séquences protéiques incluant *AtCLV1*, sur lesquelles ont été définis des blocs correspondant à des régions hautement conservées. La localisation des amorces dégénérées est proposée sur la figure 38, elles ont été définies dans le domaine intracellulaire à activité sérine/thréonine kinase.

Les amorces utilisées pour l'amplification sont *CLV1R1* et *CLV1L1* pour la première PCR et *CLV1R2* et *CLV1L2* pour la seconde PCR. Le protocole d'amplification est le même que pour *CiSTM*. Des fragments ont été observés à la taille attendue (environ 200 paires de bases), après migration sur gel d'agarose. Les produits de PCR ont été accumulés, clonés et séquencés selon la méthode précédemment citée.

Figure 37 : Etapes menant à l'obtention de l'ADNc partiel *CiCLV1p*

Séquences des amorces:

CLV1R1 5'-ATATCCATAAGATCCAGCAATAGCASWCATRCAYTC-3'

CLV1L1 5'-TGAAAAGGGAGGAGCAGGNATHGTNTA-3'

CLV1R2 5'-ATCAAGCAGAATATTATTAGACTTAAAYRTCNCCKTRG-3'

CLV1L2 5'-CAAACCTCTGGGAAGAATTAGACATAGALAYATHGTNMG-3'

CLVinvR1 5'-GCCGTGAAGGAGTTCACCTA-3'

CLVinvL1 5'-GCTTGCTTAAGTGGGATACG-3'

CLVinvR2 5'-TCGAACAAAGTGCCATTAACC-3'

CLVinvL2 5'-ATAGAAGCCGCAAAGGGTCT-3'

CLVRTspé 5'-CTTAACGTCCCGATGCATATAAG-3'

CLVRACER1 5'-ATCCCACTTAAGCACGCAAC-3'

GRCLV1 5'-CACTCCGATGCACCACCTTCATGC-3'

GRCLV2 5'-TCCCACTTAAGCACGCAACCACCTT-3'

GeneRacer5'Primer 5'-CGACTGGAGCACGAGGACACTGA

GeneRacer5'NestedPrimer 5'-GGACTGACATGGACTGAAGGAGTA

A l'issue du séquençage de 15 clones, trois groupes de séquences ont pu être définis selon les similitudes de séquence (figure 39) : groupe 1, groupe 2 et groupe 3. Des différents

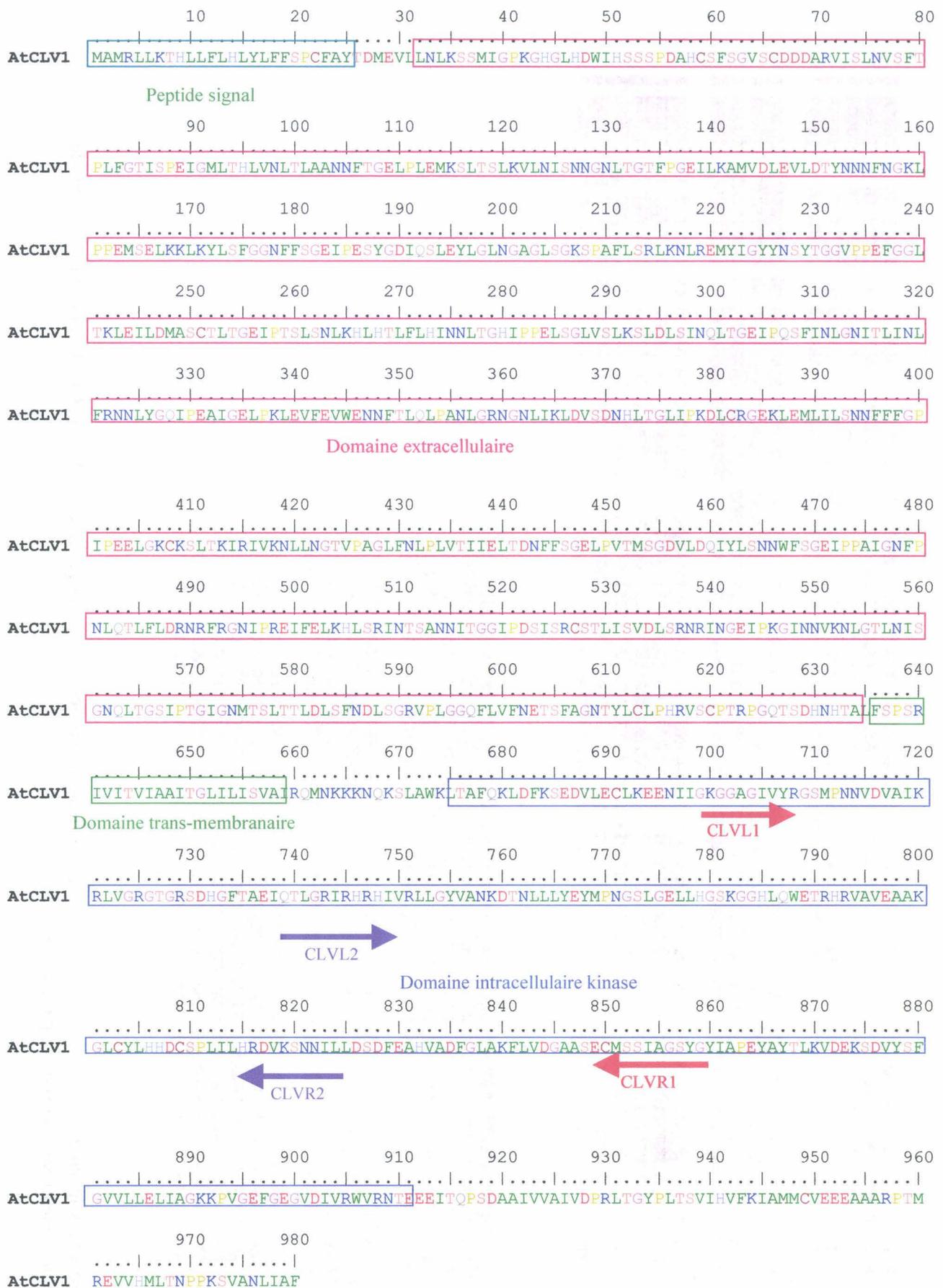


Figure 38: Localisation des différents domaines et des amorces dégénérées utilisées pour le clonage de l'ADNc partiel *CiCLV1E1* sur la séquence AtCLV1.

Résultats : Clonage des ADNc *CiSTM* et *CiCLV1p*

groupes, des séquences consensus ont été définies et les séquences consensus ont été alignées entre elles (figure 40). De même, les séquences consensus ont été traduites et les homologies de ces séquences protéiques ont été recherchées dans les banques de données. Les homologies de séquences sont proposées sur la figure 41.

La séquence consensus *CiCLV1E1gr1* présente 78% d'identité et 97% de similitude avec la séquence CLV1 du colza, 77% d'identité et 97% de similitude avec la séquence CLV1 d'*Arabidopsis* et 78% d'identité et 96% de similitude avec la séquence d'un récepteur de type kinase du soja. De même, la séquence consensus *CiCLV1E1gr2* présente 97% d'identité et 100% de similitude avec les séquences de deux récepteurs de type kinase 1 et 2 chez le soja, et 84% d'identité et 95% de similitude avec la séquence CLV1 d'*Arabidopsis*. Enfin, la séquence consensus *CiCLV1E1gr3* présente 85% d'identité et 94% de similitude avec la séquence d'un récepteur de type kinase du riz, 82% d'identité et 92% de similitude avec la séquence d'un récepteur de type kinase 2 du soja et 79% d'identité et 91% de similitude avec la séquence CLV1 d'*Arabidopsis*.

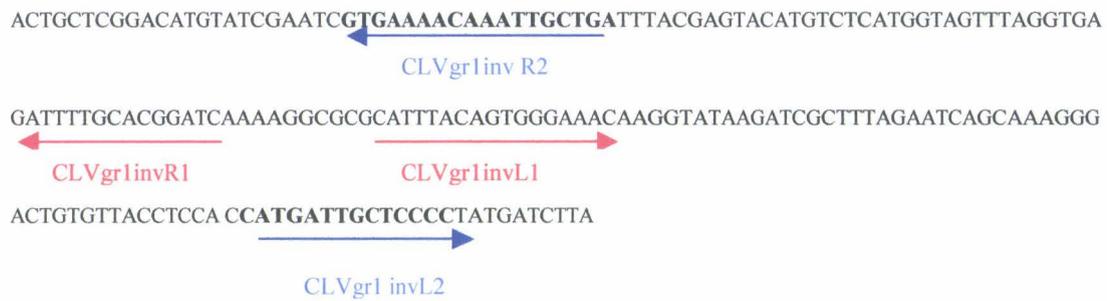
Les trois séquences consensus présentent à ce stade des résultats d'identité de séquence supérieurs à 75% avec *AtCLV1*. Ainsi, il est impossible de prédire quel groupe de séquence doit être choisi pour la suite des manipulations. Il a alors été décidé de continuer avec les trois groupes.

Etape 2 : Allongement des séquences obtenues

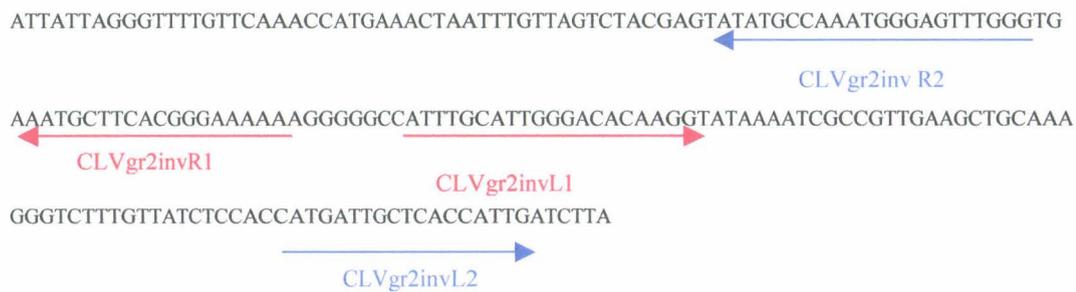
Des amorces de PCR inverse ont été définies pour les trois séquences consensus auxquelles ont été enlevées les séquences des amorces dégénérées (Figure 42). Les amorces sont nommées selon le groupe auquel elles appartiennent. Des couples d'amorces de seconde PCR ont été définis de façon à augmenter la spécificité de la PCR.

Les PCR ont été réalisées sur des autoligatures précédemment citées dans les conditions exposées pour le clonage de *CiSTM*. Un profil multi bandes a été obtenu suite à la seconde amplification (Figure 43), après migration des produits de PCR inverse. De la même manière que pour *CiSTM*, il semble que l'amplification n'a pas permis d'obtenir l'ADNc complet de *CiCLV1* puisque la taille maximale observée sur gel est de 1200 paires de bases, alors que l'ADNc complet de *AtCLV1* comprend 2943 paires de bases. Les produits amplifiés correspondent alors à des séquences partielles.

CiCLV1E1consgr1



CiCLV1E1consgr2



CiCLV1E1consgr3

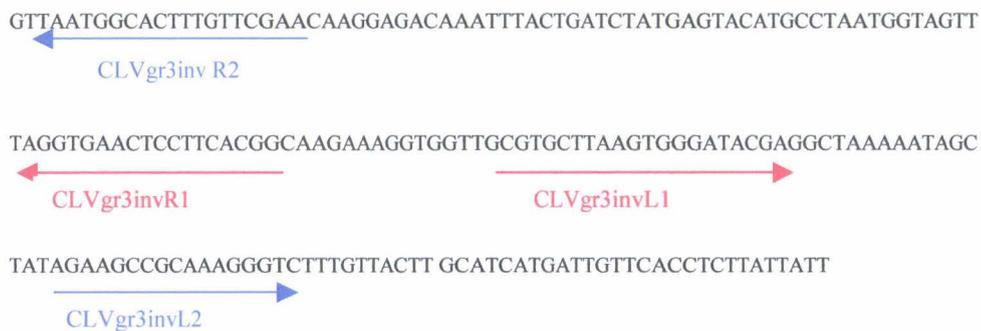


Figure 42 : Localisation des amorces de PCR inverse sur les séquences consensus obtenues après la première étape.

Résultats : Clonage des ADN_c CiSTM et CiCLV1p

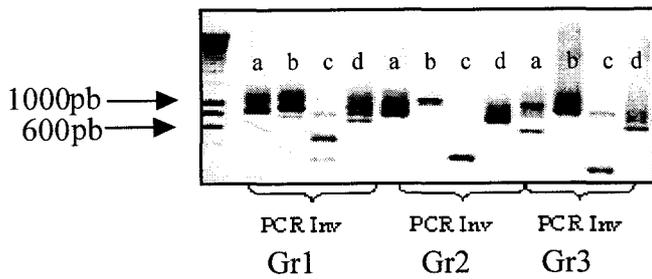


Figure 43 : Photographie du gel d'agarose après migration des produits de PCR de l'étape 2.

Les quatre pistes d'un groupe représente les amplifications sur les autoligatures XhoI (a), KpnI (b), NsiI (c) et SalI (d)

La figure 44 présente les tailles de produits de PCR amplifiés pour les différents groupes de séquences ainsi que les tailles observées sur le gel d'agarose (Figure 43).

Groupe de séquences	Autoligation utilisée	Taille du produit ligué (pb)
1	KpnI	1000
2	KpnI	1200
3	XhoI	1100
3	KpnI	1200

Figure 44 : Clonages réalisés pour les trois groupes de séquences en fonction des tailles des produits de PCR sur gel d'agarose.

Après contrôle des ligatures sur gel d'agarose, seuls les vecteurs contenant les amplifications issues des autoligatures Gr3 KpnI ont permis d'obtenir des colonies après transformation.

Suite à cette transformation, des colonies ont été repiquées et le séquençage réalisé avec l'amorce T7 selon le protocole cité.

Six clones de 728 paires de bases permettent le séquençage jusqu'à la région 3' UTR (Annexe 19). Une séquence consensus a été définie à partir de ces six clones (*consE2*). Le niveau d'identité des clones entre eux est très élevé, les différences observées sont probablement dues à des erreurs de séquençage ou de lecture ou même des erreurs de synthèse de la Taq polymérase. Il semble qu'une seule séquence ait été clonée.

Cette séquence consensus a été alignée avec la séquence consensus *CiCLVIE1* (Annexe 20) et une séquence consensus *CiCLVIE2* a été définie. Cette séquence *CiCLVIE2* a



Figure 45: Alignement de la séquence protéique déduite de la séquence consensus *CiCLV1E2* et des séquences de protéines AtCLV1-like chez *Arabidopsis thaliana* (EMBL: 065440), la séquence protéique d'un récepteur de type kinase chez le soja (GmRLK1, EMBL: Q9LKZ6) et la séquence protéique d'un récepteur de type kinase chez le riz (OsRLK1, EMBL: Q7XZW7).

Résultats : Clonage des ADNc CiSTM et CiCLV1p

été traduite et soumise aux banques de données et le résultats des alignements protéiques est présenté sur la figure 45.

La séquence consensus obtenue présente respectivement dans la région commune 76% d'identité et 92% de similitude avec la séquence AtCLV1-like*, 73% d'identité et 89% de similitude avec la séquence d'un récepteur de type kinase du soja et 73% d'identité et 89% de similitude avec la séquence d'un récepteur de type kinase chez le riz.

A nouveau, le consensus CiCLV1E2 présente des pourcentages d'identité élevés pour des séquences de protéines de récepteur de type kinase dont une séquence proche de AtCLV1 (AtCLV1-like). Dans ces conditions, nous avons préféré poursuivre le clonage de l'ADNc pleine longueur correspondant au groupe 3 plutôt que de retenter le clonage des produits de PCR inverse des deux autres groupes de séquences obtenues après l'amplification avec les amorces dégénérées.

Etape 3 phase 1 : Extension de la séquence CiCLV1E2 par 5'RACE PCR

La réussite de la technique de PCR inverse semblait mitigée puisque la région 5' n'avait pas été allongée de plus de 500 pb par l'amplification avec des amorces de PCR inverse. Du fait de la longueur de l'ADNc *AtCLV1* (≈ 3 Kb), une technique différente a été envisagée. Il s'agissait de réaliser une RT avec une amorce spécifique définie sur la séquence *CiCLV1E2* obtenue après l'étape 2 (Figure 37). Une 5'RACE PCR a ensuite été réalisée de manière à amplifier la région manquante en 5'. Les amorces de 5'RACE et l'amorce de RT spécifique sont localisées sur la figure 46.

* La séquence AtCLV1-like est une séquence proche de la séquence AtCLV1 mais différente. La dénomination "like" est donc gardée pour ne pas induire le lecteur en erreur.

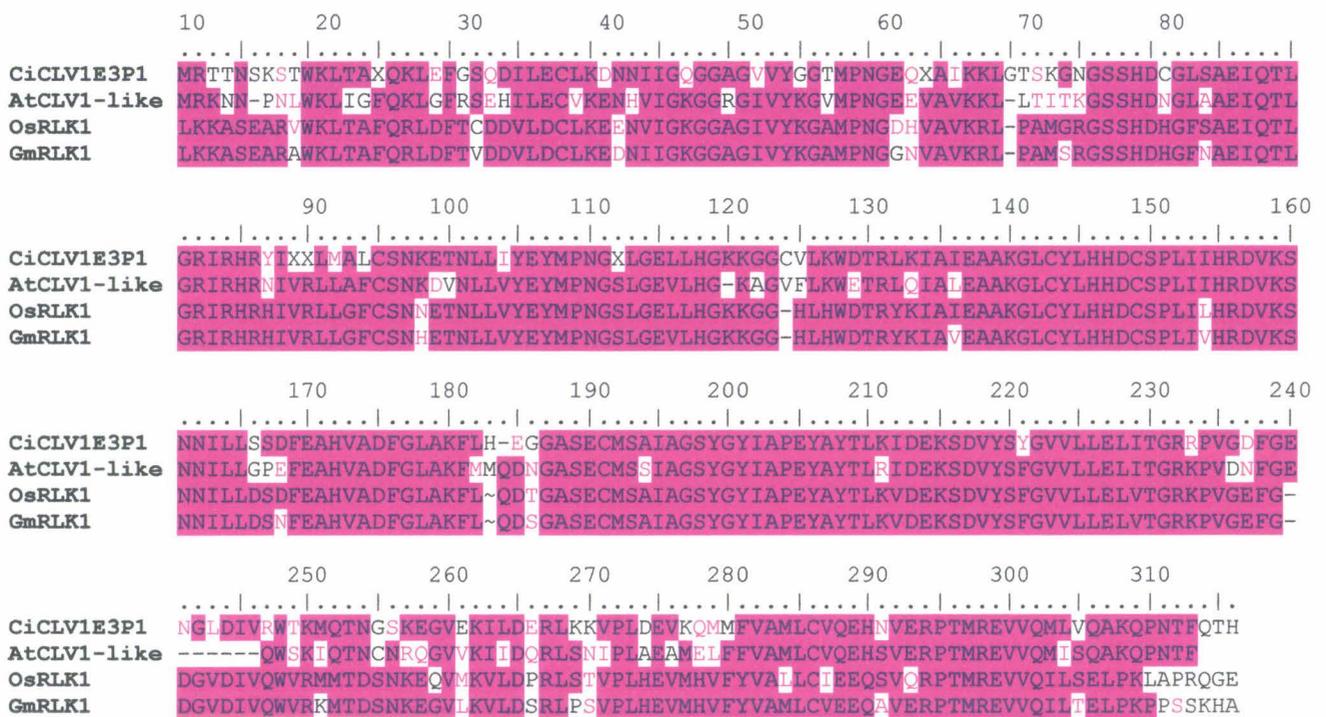


Figure 47 : Alignement de la séquence protéique déduite du consensus *CiCLV1E3P1* et les séquences de protéines AtCLV1-like chez *Arabidopsis thaliana* (EMBL: 065440), la séquence protéique d'un récepteur de type kinase chez le riz (OsRLK1, EMBL: Q7XZW7) et la séquence protéique d'un récepteur de type kinase chez le soja (GmRLK1, EMBL: Q9LKZ6).



Figure 48 : Localisation des amorces de 5' RACE utilisées avec le kit GeneRacer™ Kit sur la séquence *CiCLV1E3P1*.

Résultats : Clonage des ADNc CiSTM et CiCLV1p

```

GTTAATGGCACTTTGTTTCGAACAAGGAGACAAAATTTACTGATCTATGAGTACATGCCTAATGGTAGTTTAGGTGA
←
Clvgr3RACER2

ACTCCTTCACGGCAAGAAAGGTGTTGCGTGCTTAAGTGGGATACGAGGGCTAAAAATAGCTATAGAAGCCGCAAA
←
Clvgr3RACER1

GGGTCTTTGTTACTTGCATCATGATTGTTACCTCTTTATTATTCATCGGGACGTTAAGTCCAACAACATCTTACT
←
RT spécifique

TAGTTCAGATTTTGAGGCACATGTAGCAGATTTCGGGCTTGCAAAATTCCTTGCATGAAGGTGGTGCATCGGAGTG
TATGTCTGCTATCGCGGGTTCGTATGGTTATATTGCTCCAGAATATGCCTACACATTGAAGATTGATGAAAAAAG
TGACGTGTATAGTTATGGGGTGGTACTCTTGGAGCTAATCACGGGGCGAAGACCAGTTGGGGACTTTGGGGAAAA
TGGATTGGACATTTGTTTCGATGGACGAAAATGCAAACGAACGGGTCGAAAGAAGGAGTTGAGAAGATATTGGATGA
ACGACTGAAGAAGGTTCCACTAGATGAAGTAAAGCAGATGATGTTCCGTGGCAATGTTGTGTGTACAAGAACACAA
CGTGGAGAGACCGACCATGAGAGAGGTGGTGCAGATGCTTGTACAAGCTAAGCAGCCCAATACATTCCAAACGCA
TTAATTTTATTACTTGGTTGTAACAAAAATAAAGATTTGAGGTGGTAATTAGACGTTTGACGGTTGACGGTTGA
TGGAAAACTAATTACTTGGTGGACGGATTTTACTGAAATGTTAACATAATCGAGTTCGTTGCTACAAGGTCGATGA
ATCCTATCCTCATGTAGTTTATTTTTGTTGAAAGTTGTTG

```

Figure 46 : Localisation de l'amorce RT spécifique et des amorces de PCR inverse sur la séquence consensus *CiCLV1E2*

Les PCR ont ensuite été réalisées avec les amorces suivantes dans différentes conditions:

PCR en une étape : Clvgr3RACER1 / polyT

PCR en une étape : Clvgr3RACER2 / polyT

PCR en deux étapes : Clvgr3RACER1 / polyT avec moins de cycles en première PCR puis Clvgr3RACER2 / polyT en seconde PCR.

Après dépôt sur gel d'agarose, le résultat le plus concluant a été obtenu en première PCR avec le couple d'amorces clvgr3RACER1/polyT. Les produits de PCR ont été accumulés, purifiés, clonés et séquencés selon la méthode déjà citée. Le séquençage a été réalisé sur 8 clones dans le sens T7 et dans le sens Sp6. Le séquençage a été satisfaisant pour deux clones dans le sens Sp6 qui sont quasiment identiques. Une séquence consensus a donc été définie à partir de cet alignement (Annexe 21) et a été alignée à la séquence consensus obtenue à l'issue de l'étape 2 (Annexe 22). Cette séquence est appelée *CiCLV1E3P1*.

Cette séquence a été traduite et envoyée dans les banques de données. Les homologies de cette séquence pour les séquences les plus proches sont proposées sur la figure 47.

La séquence protéique déduite CiCV1E3P1 présente respectivement dans la région commune 71% d'identité et 87% de similitude avec la séquence AtCLV1-like, 68% d'identité

Résultats : Clonage des ADNc CiSTM et CiCLV1p

et 86% de similitude avec la séquence d'un récepteur de type kinase du riz et 68% d'identité et 86% de similitude avec la séquence d'un récepteur de type kinase chez le riz.

L'homologie la plus forte est trouvée pour la séquence protéique AtCLV1-like, ce qui confirme le résultat précédent.

Etape 3 phase 2 : 5' RACE réalisée avec le kit de Gene Racer

Les problèmes rencontrés pour l'amplification de l'ADNc pleine longueur *CiCLV1* nous ont amené à utiliser un kit d'amplification d'ADNc pleine longueur adapté à des ADNc de très grande taille (GeneRacer™Kit, Invitrogen). Le protocole d'utilisation de ce kit est décrit dans le paragraphe 4.10. du matériel et méthodes.

Deux conditions de RT ont été testées en utilisant 2 ou 4 µg d'ARN polyA purifiés selon le protocole cité.

Deux amorces, GRCLV1 et GRCLV2, ont été définies sur la séquence consensus *CiCLV1E3P1* de manière à réaliser deux amplifications successives pour augmenter la spécificité de la PCR (Figure 48). Ces amorces ont été définies de manière à être compatibles avec les amorces fournies dans le kit (GeneRacer5'Primer et GeneRacer5'NestedPrimer).

La première amplification a été réalisée sur des dilutions au 1/3, 1/9 et 1/27 des produits de RT. La seconde amplification a été réalisée sur les produits de la première PCR non dilués.

Les couples d'amorces utilisés sont les suivants :

GRCLV1/GeneRacer5'Primer

GRCLV2/GeneRacer5'NestedPrimer

Les conditions d'amplification sont détaillées dans le matériel et méthodes. Les produits de la seconde PCR ont été déposés sur gel d'agarose. Une bande à 1 Kb est obtenue dans la condition où la RT est réalisée avec 4 µg d'ARN polyA et où la première PCR utilise les produits de RT dilués au 1/3. Les produits de seconde PCR ont donc été accumulés dans ces conditions et clonés comme précédemment décrit. Une transformation des bactéries JM109 a été réalisée. Des colonies ont été récupérées après culture une nuit à 37°C.

Il semble à nouveau que cette amplification n'ait pas permis d'amplifier toute la région manquante en 5'. En effet, une bande d'environ 1,8 Kb serait attendue sans la séquence UTR en 5' alors que l'on obtient environ 900 pb. Cette amplification a donc permis d'allonger notre séquence partielle d'ADNc sans l'obtenir en entier.

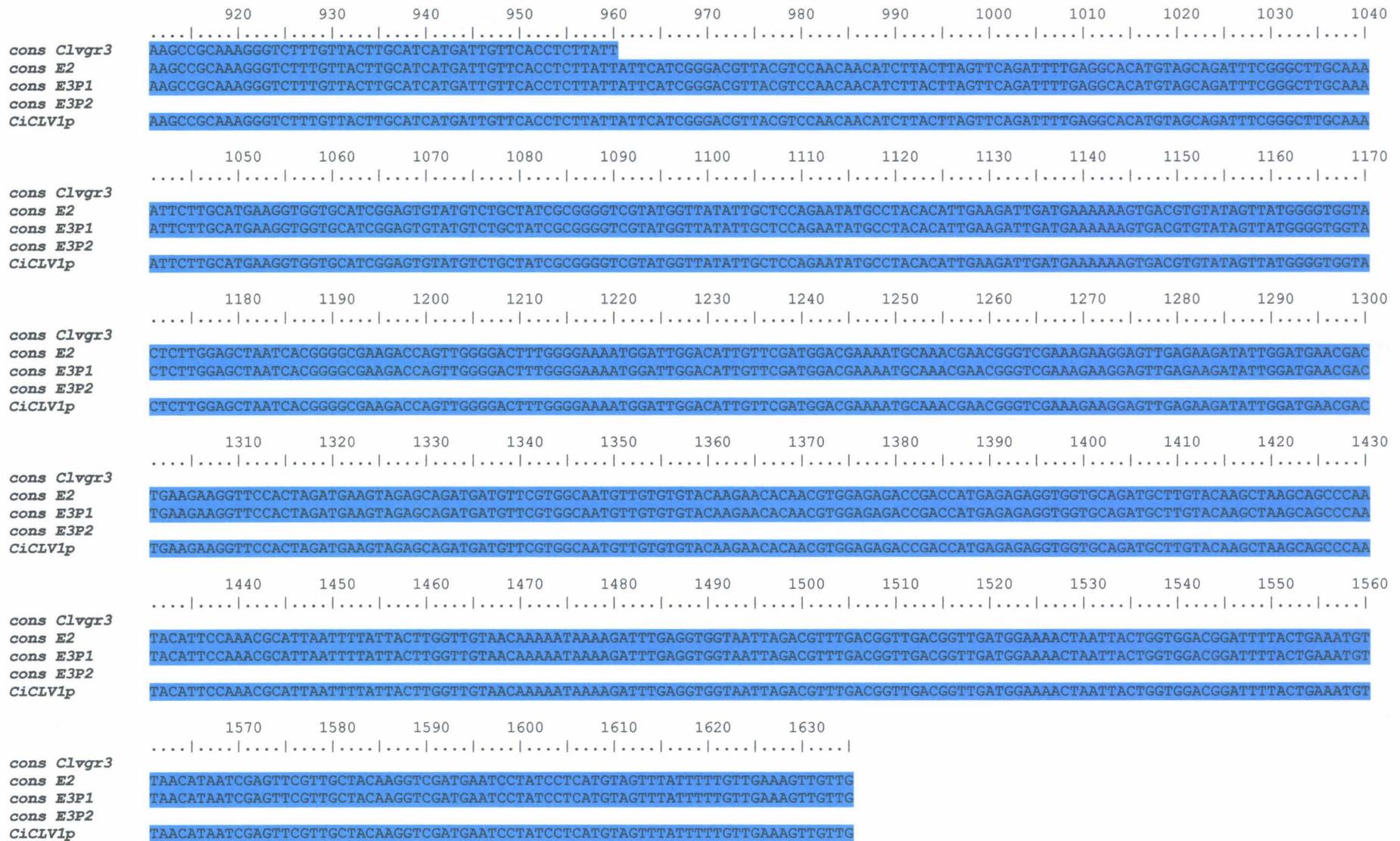


Figure 49 : Alignement des différentes séquences consensus obtenues aux différentes étapes du clonage de *CiCLV1p*.

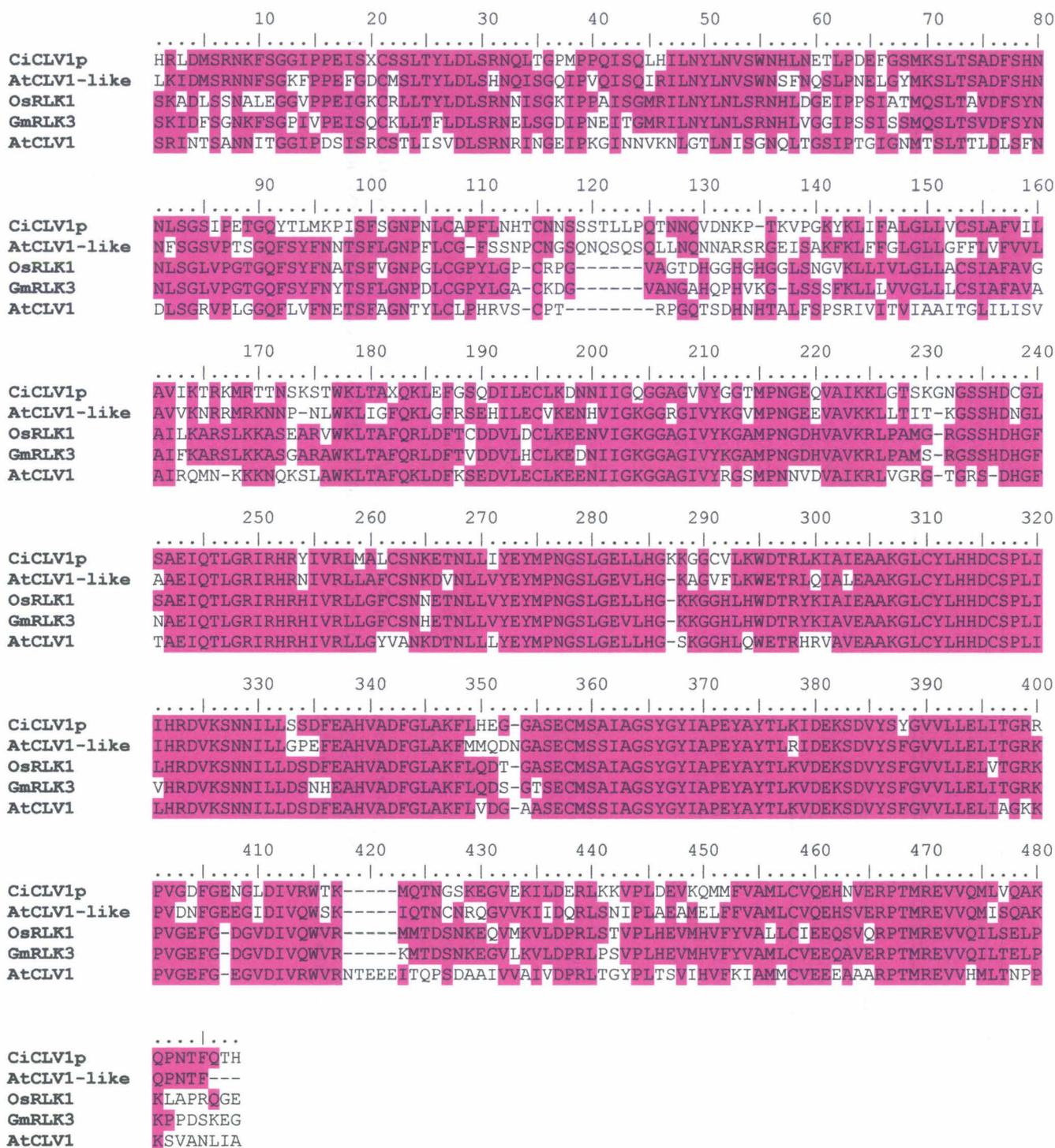


Figure 51: Alignement de la séquence protéique CiCLV1p et les séquences de protéines AtCLV1-like chez *Arabidopsis thaliana* (EMBL: 065440), la séquence protéique d'un récepteur de type kinase chez le riz (OsRLK1, EMBL: Q7XZW7), la séquence protéique d'un récepteur de type kinase chez le soja (GmRLK3, EMBL: Q9LKZ4) et de la séquence AtCLV1 chez *Arabidopsis thaliana* (EMBL : Q9SYQ8).



Figure 52: Localisation des régions conservées et des quatre derniers motifs LRR de AtCLV1 et AtCLV1-like et leur position sur la séquence CiCLV1p selon Pfam (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/>): en noir les motifs LRR, en bleu la région extracellulaire, en rouge le domaine transmembranaire et en violet le domaine kinase.

Résultats : Clonage des ADNc CiSTM et CiCLV1p

Le séquençage a été réalisé selon le protocole décrit. Huit clones ont été séquencés avec l'amorce T7 et ces mêmes clones ont ensuite été séquencés avec l'amorce Sp6.

Deux clones séquencés dans les deux sens ont été conservés et alignés pour l'analyse de séquence (Annexe 23) et une séquence consensus *E3P2* a été déduite de cet alignement. Cette séquence a été alignée à la séquence consensus *CiCLVIE3P1* (Annexe 24). La figure 49 propose un alignement des différentes séquences consensus obtenues aux différentes étapes.

A l'issue de l'alignement entre les différentes séquences consensus obtenues, une séquence consensus finale nommée *CiCLV1p* (p pour partielle) a été déduite. La séquence obtenue possède 1635 paires de bases et comprend 187 paires de bases de l'UTR en 3'. La séquence est incomplète mais la séquence codante représente 1431 paires de bases et donc 477 acides aminés après traduction (Figure 50).

Cette séquence a ensuite été envoyée traduite dans les banques de données et les homologues de séquences sont proposées sur la figure 51. Cette séquence consensus *CiCV1p* présente respectivement dans la région commune 66% d'identité et 85% de similitude avec la séquence *AtCLV1-like*, 60% d'identité et 80% de similitude avec la séquence d'un récepteur de type kinase du riz, 60% d'identité et 80% de similitude avec la séquence d'un récepteur de type kinase chez le riz et 54% d'identité et 75% de similitude avec la séquence *AtCLV1*.

Une nouvelle tentative de 5'RACE a été réalisée avec des amorces définies sur la séquence consensus *E3P2* mais cet essai n'a pas été concluant.

1.4. Analyses de la séquence *CiCLV1p*

De même que pour *CiSTM*, il a été possible d'identifier sur la séquence *CiCLV1p* les régions conservées communes aux récepteurs de type kinase de plantes (Figure 52). Ces régions sont : une région intracellulaire qui est majoritairement constituée du domaine kinase, une région transmembranaire et une région extracellulaire qui comprend des motifs LRR. Ces différentes régions ont été replacées sur un alignement des séquences *CiCLV1p*, *AtCLV1* et *AtCLV1-like*.

Les motifs LRR sont des séquences de 20 à 29 résidus présentes dans un grand nombre de protéines dont les fonctions varient. La fonction principale de ces motifs serait de fournir une structure permettant des interactions protéines-protéines. Ces séquences contiennent un motif consensus de onze acides aminés: $LxxLxLxx^N/CxL$, x pouvant être un acide aminé

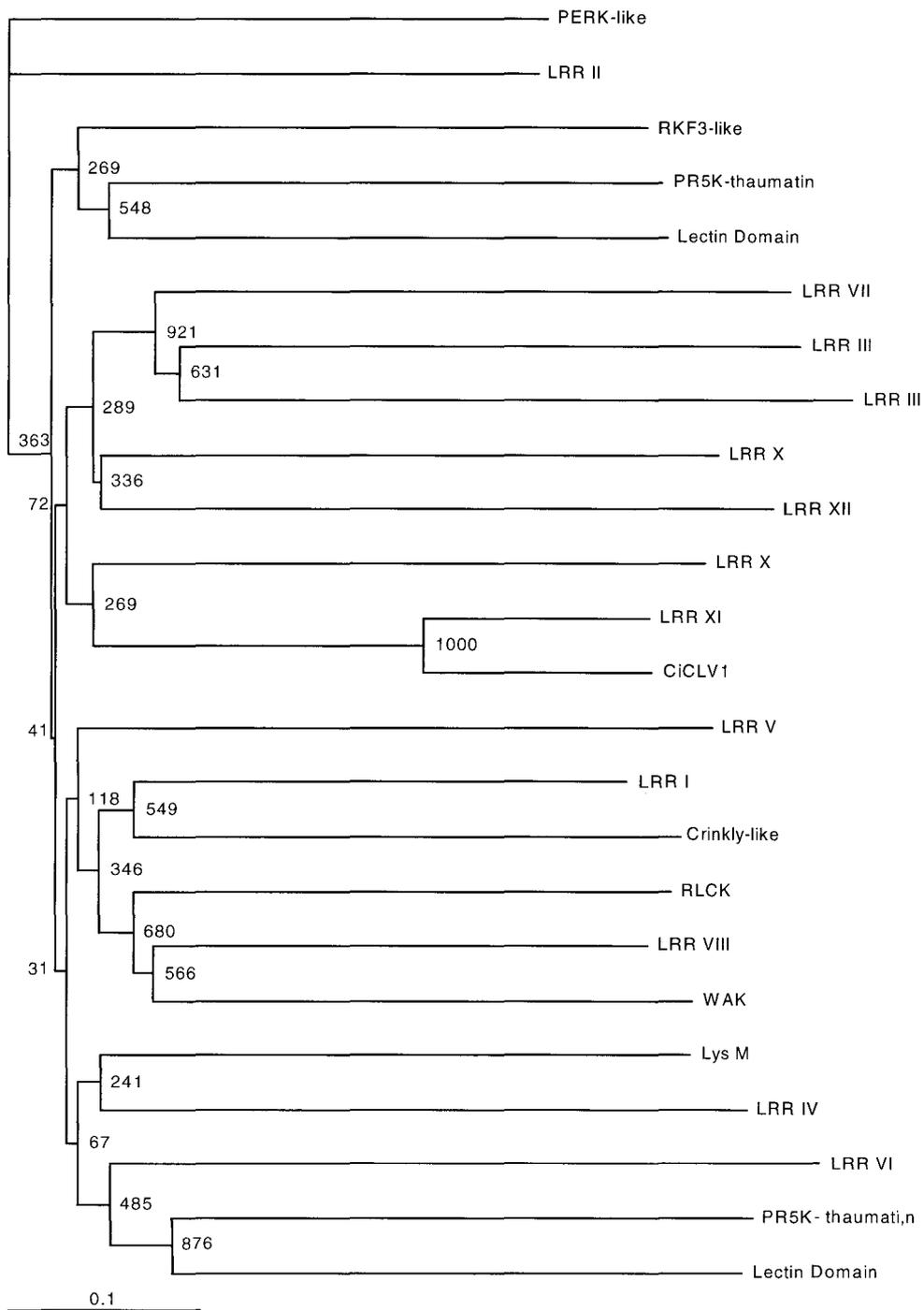


Figure 54 : Arbre phylogénétique de membres représentatifs des sous-familles des séquences de récepteurs de type kinase. Les noms des séquences et leur numéro d'accèsion sont détaillés en annexe 25.

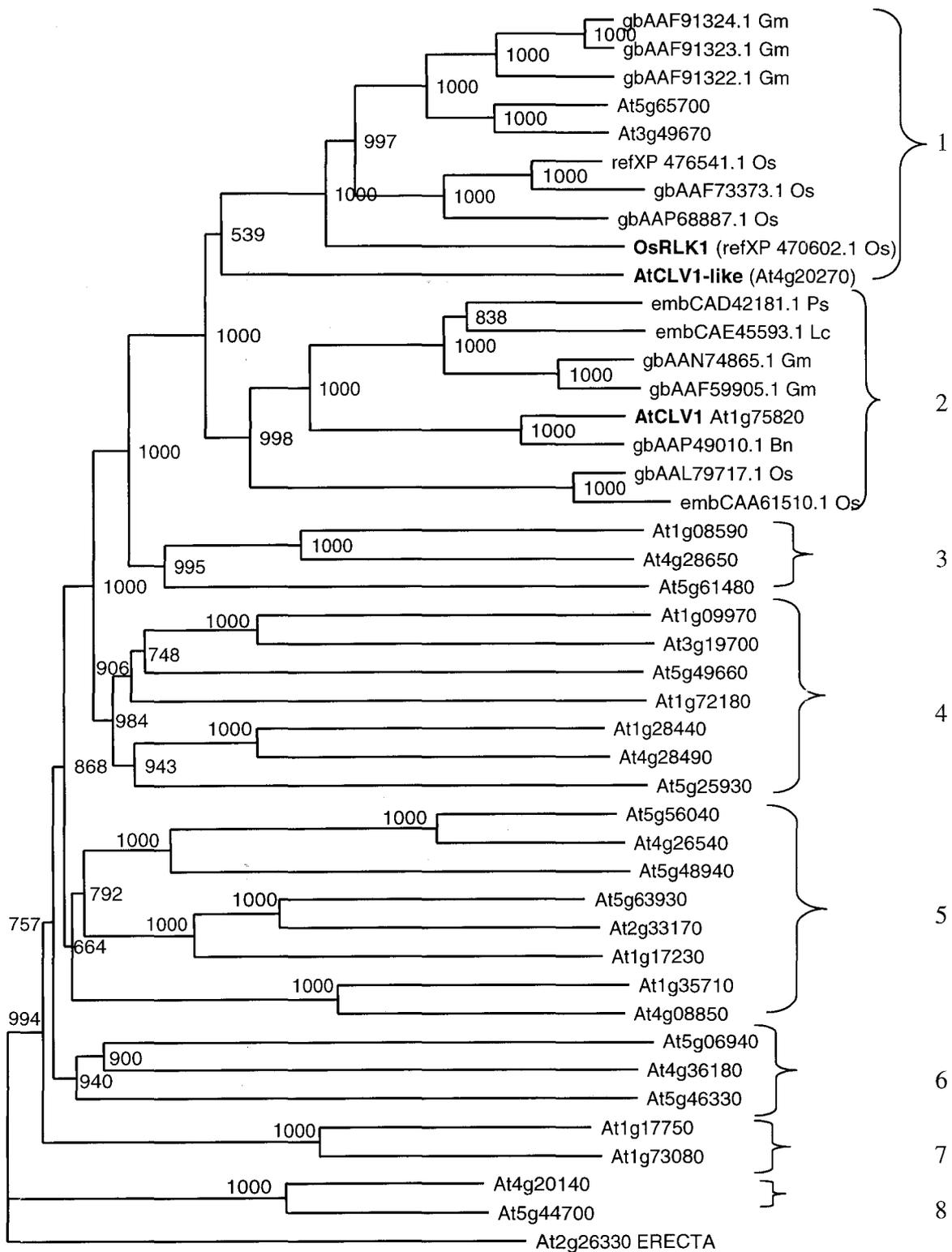


Figure 55 : Analyse phylogénétique des séquences complètes de la sous famille des LRR XI d'*Arabidopsis* et des séquences d'autres espèces dont l'identité avec *AtCLV1* est supérieure à 50%. Les préfixes ou suffixes des noms de séquences correspondent aux noms de genre et d'espèce : At : *Arabidopsis thaliana*, Bn : *Brassica napus*, Gm : *Glycine max*, Lc : *Lotus corniculatus*, Zm : *Zea mays*, Os : *Oryza sativa*, Ps : *Pisum sativum*. Les différents membres de la sous-famille LRR XI peuvent être classés en huit groupes.

La séquence ERECTA est un représentant de la sous-famille des LRR X qui a été utilisée pour déterminer la racine de l'arbre.

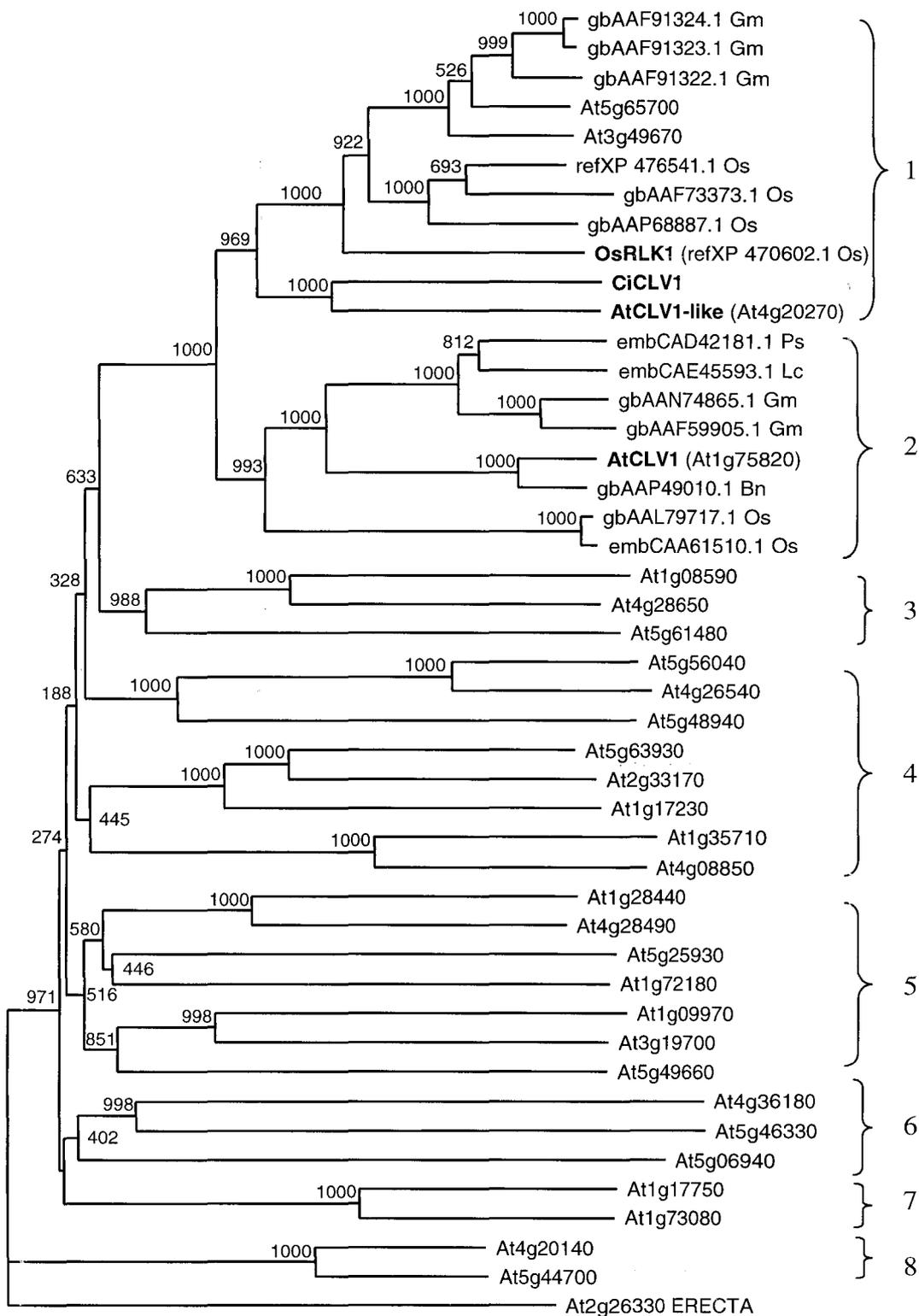


Figure 56 : Analyse phylogénétique des séquences partielles communes à CiCLV1p de la sous famille des LRR XI d'*Arabidopsis* et des séquences d'autres espèces dont l'identité pour AtCLV1 est supérieure à 50%. Les préfixes ou suffixes des noms de séquences correspondent aux noms de genre et d'espèce : At : *Arabidopsis thaliana*, Bn : *Brassica napus*, Gm : *Glycine max*, Lc : *Lotus corniculatus*, Ci : *Cichorium intybus*, Zm : *Zea mays*, Os : *Oryza sativa*, Ps : *Pisum sativum*. Les huit groupes reprennent ceux définis sur la figure 55.

La séquence ERECTA est un représentant de la sous-famille des LRR X qui a été utilisée pour déterminer la racine de l'arbre.

Résultats : Clonage des ADNc CiSTM et CiCLV1p

Selon la classification décrite par Shiu et Bleecker (2003), réalisée à partir d'une phylogénie des domaines kinase des RLK d'*Arabidopsis*, les protéines apparentées à AtCLV1 sont regroupées dans la sous-famille des LRR XI. Afin de déterminer à quelle sous famille la séquence CiCLV1p est attachée, nous avons réalisé un arbre phylogénétique des séquences des domaines kinase des membres représentatifs de la majorité des sous-familles décrites et de la séquence CiCLV1p. Les séquences d'*Arabidopsis* ont été obtenues à partir de la base de données "Plant K" (<http://plantsp.sdsc.edu/plantsp/family/class.html>).

L'arbre est représenté sur la figure 54. La séquence CiCLV1p est groupée de façon robuste avec la séquence AtCLV1-like (At4g20270), choisie comme représentative de la sous-famille des LRR XI.

La sous-famille des LRR XI comprend 29 membres chez *Arabidopsis* (<http://plantsp.sdsc.edu/plantsp/family/class.html>). Toutes ces protéines possèdent un domaine extra-cellulaire contenant quinze à trente motifs LRR, plus ou moins conservés.

Pour préciser l'homologie de notre séquence partielle CiCLV1p, nous avons tout d'abord réalisé une étude de phylogénie avec les 29 séquences complètes des LRR XI d'*Arabidopsis* et des séquences d'autres espèces dont l'identité est supérieures à 50% avec la séquence AtCLV1.

L'arbre est représenté sur la figure 55. Huit groupes majeurs de séquences peuvent être distingués sur cet arbre. La robustesse des noeuds qui a permis ce découpage en huit groupe est élevée car les valeurs de bootstrap sont toujours supérieures à 650. La séquence CiCLV1-like qui est la plus proche de la séquence CiCLV1p est rattachée au groupe 1 et la séquence AtCLV1 est rattachée au groupe 2.

Ne disposant pas de la séquence CiCLV1 complète, nous avons alors refait l'analyse phylogénétique en ne considérant que la partie de séquence commune à CiCLV1p présente chez les protéines de la sous-famille des LRR XI (Figure 56). Le découpage en huit groupes de séquences de l'arbre précédent est à nouveau possible sur ces séquences partielles qui restent associées de la même manière. La séquence CiCLV1p est attachée au groupe 1 et se trouve proche de AtCLV1-like. Notre séquence CiCLV1 ne semble donc pas être l'orthologue de AtCLV1, même si elle se trouve dans un groupe proche. Il semble cependant que l'analyse soit moins robuste que sur les séquences complètes (valeur de bootstrap moins élevées).

Le fait que les séquences incomplètes soient groupées de la même façon que les séquences complètes suggère fortement que la séquence CiCLV1 complète soit rattachée au groupe 1.

Discussion

Les clonages réalisés ont permis d'isoler l'ADNc complet *CiSTM* et l'ADNc partiel *CiCLV1p*. Ainsi, la première étape de ces deux clonages, à savoir l'amplification avec des amorces dégénérées a été très efficace. En effet, dès les premiers séquencages, les ADNc partiels obtenus montraient de fortes homologies avec les séquences candidates. Cette étape a donc été dans notre cas l'étape déterminante pour la poursuite de l'étude.

Les étapes suivantes de PCR inverse se sont révélées de difficulté plus importante, puisque nous étions en présence d'ADNc relativement longs, surtout en ce qui concerne *CiCLV1p*, qui s'il est l'homologue de *AtCLV1*, possède presque 3 kb. La technique de PCR inverse semble assez fiable pour obtenir rapidement les extrémités 3' des ADNc mais est plutôt destinée à des ADNc peu ou pas trop longs. Le maximum de longueur obtenue par amplification inverse était dans notre cas de environ 1000 paires de bases.

La solution aurait peut-être été d'utiliser dès le début des amplifications le kit "Gene Racer" qui s'applique très bien dans le cas d'ADNc longs. Une autre tentative aurait donc été nécessaire pour cloner la partie manquante de l'ADNc pleine longueur *CiCLV1p*.

Cependant, cette stratégie à plusieurs étapes semble bonne puisque au fur et à mesure des différentes étapes il a toujours été possible de réaliser les jonctions entre les parties nouvellement séquencées et les séquences à partir desquelles avaient été définies les amorces.

A l'issue des différentes étapes de clonage de *CiSTM*, les homologies les plus fortes au niveau protéique ont été trouvées pour *AtSTM* et des séquences proches chez d'autres espèces.

L'étude de phylogénie réalisée avec différentes séquences de type *KNOTTED-I* et *KNOTTED-II* a permis de rattacher notre séquence protéique *CiSTM* de façon robuste au groupe *STM* des *KNOTTED-I*. De plus, chaque classe de gènes *KNOTTED* se distingue par des homologies de séquences dans les domaines conservés mais aussi par la position de l'intron unique présent dans ces gènes (Kerstetter *et al.*, 1994). Il serait alors intéressant de cloner la séquence nucléotidique de *CiSTM* et de déterminer la position de l'intron afin de comparer la structure du gène *CiSTM* avec celle des autres gènes *KNOTTED*.

Concernant la séquence protéique *CiSTM*, on peut constater que les homologies protéiques trouvées sont soit pour des séquences appartenant au tournesol (même famille que

Discussion

la chicorée) soit pour des séquences protéiques dont les gènes sont impliqués dans le développement du méristème. Parmi le groupe STM, on trouve la protéine SBH1 isolée chez le soja (Ma *et al.*, 1994). Initialement, cette protéine montrait des homologies pour KN1. En effet, l'ADNc avait été isolé en utilisant l'ADNc *KN1* comme sonde hétérologue, puis le séquençage avait montré des homologies de séquences protéiques déduites entre KN1 et SBH1 de 87,5% dans l'homéodomaine. Plus tard, cette protéine a été classée dans le groupe STM (Bharathan *et al.*, 1999). Les transcrits *SBH1* sont exprimés au cours des stades précoces de l'embryogenèse somatique du soja, leur expression augmente pendant la formation des cotylédons et diminue ensuite. *KN1* est lui aussi exprimé au sein des méristèmes apicaux caulinaires (Jackson *et al.*, 1994).

Les protéines du groupe STM : STM, LET6 (tomate) et NTH15 (soja) sont toutes les trois exprimées avec un profil identique dans le MAC à l'exception de LET6 qui est aussi exprimée dans les feuilles (Reiser *et al.*, 2000). De même, les transcrits du gène *INVAGINATA* (*INA*) sont détectés dans le méristème apical caulinaire. Chez les mutants *ina*, l'expression de ce gène est réduite (Golz *et al.*, 2002).

Le fait que les protéines homologues à CiSTM soient exprimées au sein du MAC, comme c'est le cas pour toutes les protéines KNOTTED-I (Reiser *et al.*, 2000), suggère une implication de *CiSTM* dans les cellules qui changent d'identité comme dans le MAC.

De même que pour CiSTM, la séquence partielle CiCLV1p a été analysée. A l'issue du clonage, les homologies de séquences les plus fortes ont été trouvées pour la séquence CiCLV1-like qui est une séquence proche de AtCLV1.

Sur la partie disponible de la séquence, il a été possible de localiser les régions conservées propres aux séquences de récepteurs de type kinase. Dans le domaine extracellulaire, quatre motifs LRR ont été identifiés selon le modèle de Becraft (1998).

Une analyse phylogénétique nous a permis de rattacher notre séquence à la sous-famille des LRR XI dont font partie AtCLV1 et AtCLV1-like (<http://plantsp.sdsc.edu/plantsp/family/class.html>).

L'homologie entre AtCLV1, AtCLV1-like et CiCLV1p a été précisée par l'analyse phylogénétique des différents membres de la sous-famille des LRR XI. Il apparaît au vue des analyses que le gène *CiCLV1* n'est probablement pas l'orthologue de *AtCLV1* mais plutôt celui du gène *AtCLV1-like*. Cependant, nous pouvons penser qu'il existe au moins un gène orthologue de *AtCLV1* chez la chicorée puisque des gènes de plusieurs espèces Dicotylédones et de riz s'avèrent très proches de la séquence AtCLV1 (groupe 2, Figure 55). Malgré ces

Discussion

différences structurales, il reste possible que le gène *CiCLV1* ait une fonction équivalente ou proche (plus ou moins redondante) de celle de *AtCLV1*.

En effet, le gène *OsRLK1* de riz, dont la séquence protéique déduite est classée comme CiCLV1p dans le groupe 1, est exprimé dans les méristèmes floraux (Kim, 2000). Dans ces conditions, il semblait alors tout à fait intéressant d'étudier le profil d'expression du gène CiCLV1p au cours des embryogenèses zygotique et somatique de la chicorée.

2. Observations cytologiques

2.1. Observation des coupes réalisées aux différents jours d'une cinétique de développement d'akènes de chicorée.

L'embryogenèse constitue un stade critique du cycle de la vie d'une plante, au cours duquel se mettent en place les fondations de la future architecture de la plante (Harada, 1999). Si l'embryogenèse zygotique des Angiospermes Dicotylédones est relativement bien décrite dans la littérature (West et Harada, 1993 ; Berleth, 1998), nous ne disposons pas d'une telle étude concernant la chicorée. Il nous est alors apparu intéressant de réaliser cette cinétique, d'une part pour observer les embryons zygotiques, et d'autre part pour obtenir des ARN de ces mêmes embryons, dans le but d'étudier l'expression de nos gènes candidats. Une attention particulière a été portée sur la mise en place des territoires présomptifs des méristèmes et plus particulièrement les initiales du MAC.

Alors que l'embryogenèse zygotique résulte de la fusion de deux patrimoines génétiquement différents, les cellules végétales sont capables d'initier des structures embryogènes sans fécondation. Ainsi l'embryon qui en résulte suit les mêmes phases de développement que son homologue zygotique, ce qui suggère d'ailleurs que la fécondation n'est pas une étape nécessaire à la mise en place d'un patron développemental. Néanmoins, il semble que cette phase de développement nécessite l'expression de gènes exprimés au cours de l'embryogenèse zygotique. L'intérêt sera alors de comparer l'expression de nos gènes candidats au cours de l'embryogenèse somatique et au cours de l'embryogenèse zygotique.

Des coupes semi fines ont été réalisées sur des akènes prélevés avant la pollinisation (J0) puis sur des akènes prélevés régulièrement à différentes heures après la pollinisation (hap) puis à différents jours après la pollinisation (jap). Des photos des différents stades sont présentées sur la figure 57.

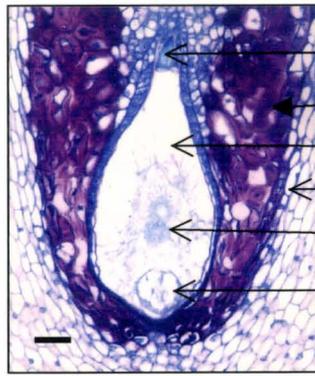
On distingue à J0 le sac embryonnaire logé dans le nucelle, réagissant fortement à la coloration, et la cellule centrale du sac embryonnaire, très vacuolisée. Un ovule anatrope est disposé dans ce nucelle dont il est difficile d'observer les deux téguments caractéristiques des Angiospermes. On peut néanmoins positionner le micropyle. A noter qu'il est difficile d'observer les huit cellules du sac embryonnaire sur un même plan de coupe.

A 18 hap, on observe le premier stade zygote, où la première cellule embryonnaire est visible ainsi que la première cellule suspensoriale. L'albumen n'est pas cellularisé, le noyau

F
E
C
O
N
D
A
T
I
O
N

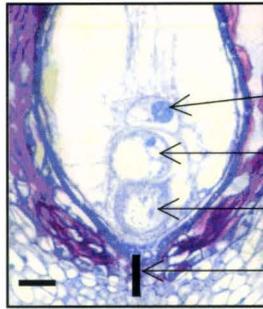
Q
U
A
D
R
A
N
T
D
E
R
M
A
R
T
O
G
E
N
E

G
L
O
B
U
L
A
I
R
E
C
O
R
D
I
F
O
R
M
E



Barre = 10 μ m

18 hap



Barre = 20 μ m

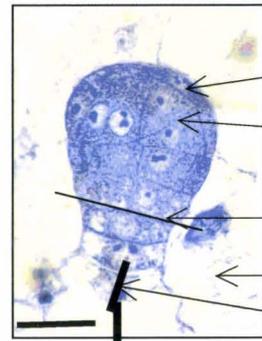
24 hap



Barre = 20 μ m

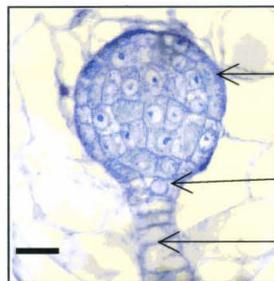
34 hap

38 hap



Barre = 30 μ m

2 jap



Barre = 20 μ m

3 jap

4 jap

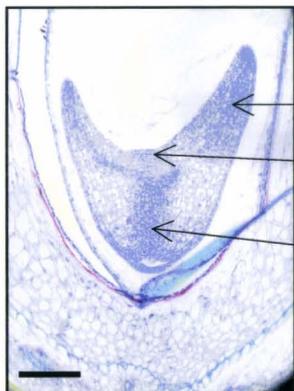


Barre = 20 μ m

5 jap

T
O
R
P
I
L
L
E

6 jap



Procambium cotylédonaire

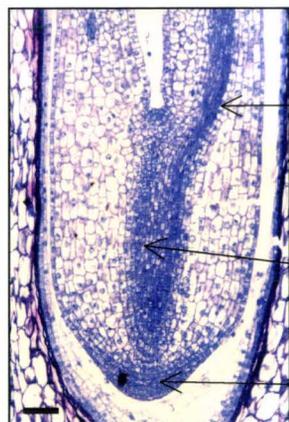
Zone de la gemmule: territoire pré-caulinaire

Procambium hypocotylaire

Barre = 100 μ m

C
O
T
Y
L
E
D
O
N
A
I
R
E
1

7 jap



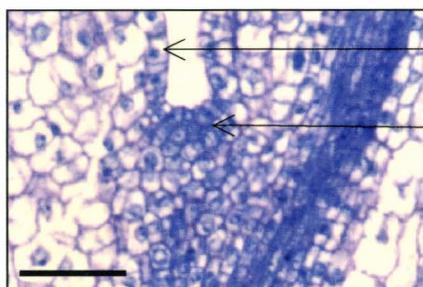
Procambium cotylédonaire

Procambium hypocotylaire

Coiffe

Barre = 100 μ m

8 jap



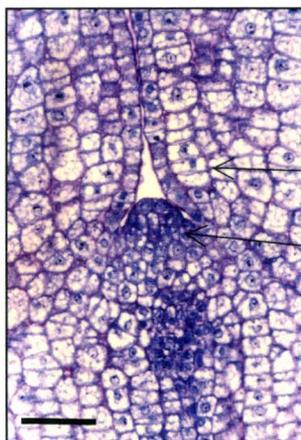
Epiderme

Emergence d'un dôme

Barre = 50 μ m

C
O
T
Y
L
E
D
O
N
A
I
R
E
2

13 jap

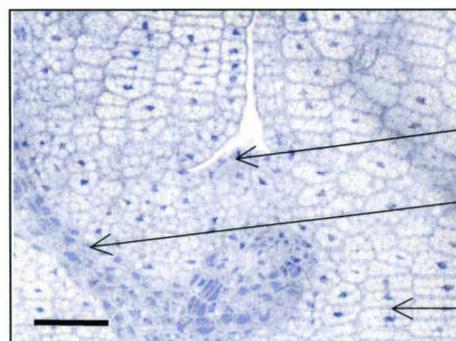


Nombreuses divisions anticlines

Gemmule

Barre = 50 μ m

19 jap



Gemmule

Procambium cotylédonaire

Nombreuses cellules aplaties issues de divisions anticlines

Barre = 50 μ m

Figure 57: Stades caractéristiques de l'embryogenèse zygotique de la chicorée.

Résultats : Observations cytologiques

3n est toujours présent. L'ensemble du gamétophyte mesure à ce stade entre 200 et 300 μm et reste dans l'axe du micropyle.

Entre 24 et 48 hap, on assiste à la cellularisation de l'albumen et on observe une étape de pro-embryogenèse caractérisée par une phase de segmentation qui recouvre les stades quadrant-octant. Chez certains Angiospermes, *Arabidopsis* et Pétunia par exemple, on peut observer une succession ordonnée de division dont les plans ont conduit à une modélisation et à la notion de lignage cellulaire. Chez *Arabidopsis*, la première division est asymétrique. Les cloisonnements conduisent d'abord à l'obtention d'un octant dont le devenir des cellules (lignage) est parfaitement déterminé. Ces modalités de division apparaissent identiques chez la chicorée.

Pendant ce temps, au niveau de la partie basale, des recloisonnements transversaux conduisent à la formation d'un suspenseur unisériel. A ce stade, un angle est formé entre l'axe embryonnaire du suspenseur et l'axe du micropyle.

Entre 34 et 48 hap, l'embryon passe par le stade dermatogène (Laux et Jürgens, 1997). D'un point de vue cytologique, les cellules du suspenseur présentent une structure vacuolisée avec un cytoplasme peu dense. Les cellules embryonnaires apparaissent très denses et peu vacuolisées.

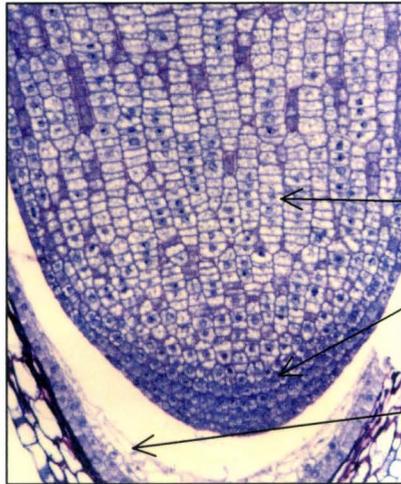
Entre 2 et 3 jap, on observe un embryon globulaire, ce qui suggère que la phase de segmentation se déroule au moyen de divisions actives. Il est déjà à noter à ce stade des différences cytologiques dans les cellules embryonnaires : le protoderme est mis en place. L'albumen est toujours cellularisé.

Si la phase de segmentation est rapide jusqu'à 2 jap, il y a peu de modifications entre 2 et 4 jap. On peut néanmoins penser que certains embryons sont entrés dans la phase d'organogenèse.

Entre 4 et 5 jap, on observe une transition entre les stades globulaire et cordiforme. L'albumen cellularisé est en cours de désagrégation. Le passage du stade globulaire au stade cordiforme signifie pour l'embryon le changement de symétrie (axiale à bilatérale). Ceci est alors concomitant avec l'initiation de deux primordium cotylédonaire. Le territoire précaulinaire du MAC embryonnaire se mettra en place entre ces deux futurs cotylédons.

Le stade torpille est mis en place entre 5 et 6 jap, où l'embryon subit une rotation sur lui même. Il est toujours relié à la "paroi" du sac embryonnaire par le suspenseur. Trois ou quatre assises cellulaires forment la coiffe. Les procambiums cotylédonaire et hypocotylaire sont mis en place.

A



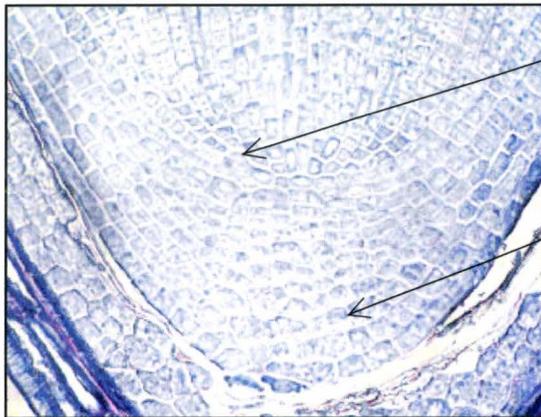
Embryon à 11-13 jap

Division anticlines des cellules corticales

Détail du pôle racinaire et de l'organisation en couches cellulaires de la coiffe

Reste de l'albumen

B

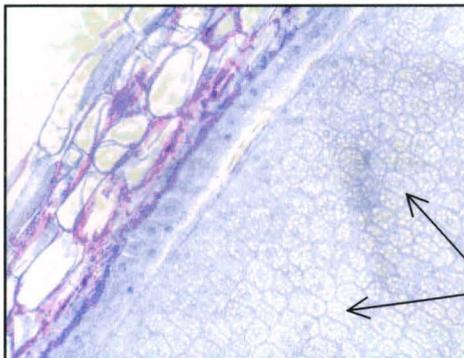


Zone du méristème apical racinaire

Coiffe racinaire composée de nombreuses couches

Embryon à 17 jap

C



Embryon à 13 jap

Détail des restes du nucelle (rose) et du sac gamétophytique au niveau des cotylédons

Réserves accumulées dans les cellules

Figure 58 :

Divisions anticlines dans l'embryon cotylédonaire (A).

Localisation des territoires cellulaires à 17 jap (B).

Accumulations de réserves dans les cellules de l'embryon(C).

Résultats : Observations cytologiques

Entre 7 et 8 jap on atteint le stade que l'on nommera cotylédonaire 1 chez la chicorée, où l'extrémité des cotylédons n'atteint pas le sommet de l'akène. A ce stade, des événements cruciaux sont visibles dans ces embryons. Il s'agit de la mise en place des cellules initiales des méristèmes apicaux et racinaires. La mise en place des cellules initiales du méristème apical est caractérisée par l'émergence d'un dôme. Les cellules de ce dôme ont des caractéristiques cytologiques propres aux cellules méristématiques : cytoplasme dense, isodiamétrie. Des zones diffuses de procambium cotylédonaire se différencient sous la forme de cellules plus allongées, dans l'axe de l'organe. Les zones fusionnent par la suite et forment un cordon vasculaire continu avec le procambium hypocotylaire.

Entre 11 et 13 jap, les cotylédons atteignent le sommet de la graine, l'embryon de chicorée est au stade nommé cotylédonaire 2. A ce stade, l'embryon grandit grâce à des divisions anticlines. L'albumen a quasiment disparu. Les cellules contiennent des globules qui confèrent aux cellules un aspect gonflé (Cf figure 58). Ces globules contiennent des réserves dont la nature est inconnue, une étude biochimique est en cours pour préciser leur nature.

Entre 13 et 17 jap, différents territoires sont nettement visibles : coiffe, gemmule, procambium.

Sur la figure 58, des photos de zones racinaires sont présentées. Entre 11 et 13 jap, de nombreuses divisions anticlines accompagnent le développement de l'embryon (A). La coiffe est nettement formée. L'enveloppe est pluricellulaire. L'albumen est à l'état de fantômes pariétaux. A 17 jap (B), il est possible de localiser des territoires cellulaires pour les différentes régions de la racine : coiffe et zone du MAR (Méristème Apical Racinaire). Les cellules sont gonflées par des accumulations de réserves dont la nature reste inconnue à ce stade de l'étude (C).

2.2. Etablissement d'un référentiel de figures cytologiques observées chez les nouveaux génotypes au cours de la culture en condition embryogène.

Le matériel précédemment utilisé au laboratoire était cytologiquement bien caractérisé. En effet, chez l'hybride "474" ces figures se répartissaient parmi les classes suivantes : des cellules en cours de réactivation (CER), des cellules réactivées (CR), des zones de division dense (ZD), qui devenaient des embryons somatiques (confirmé par des observations macroscopiques) et des bourgeons.

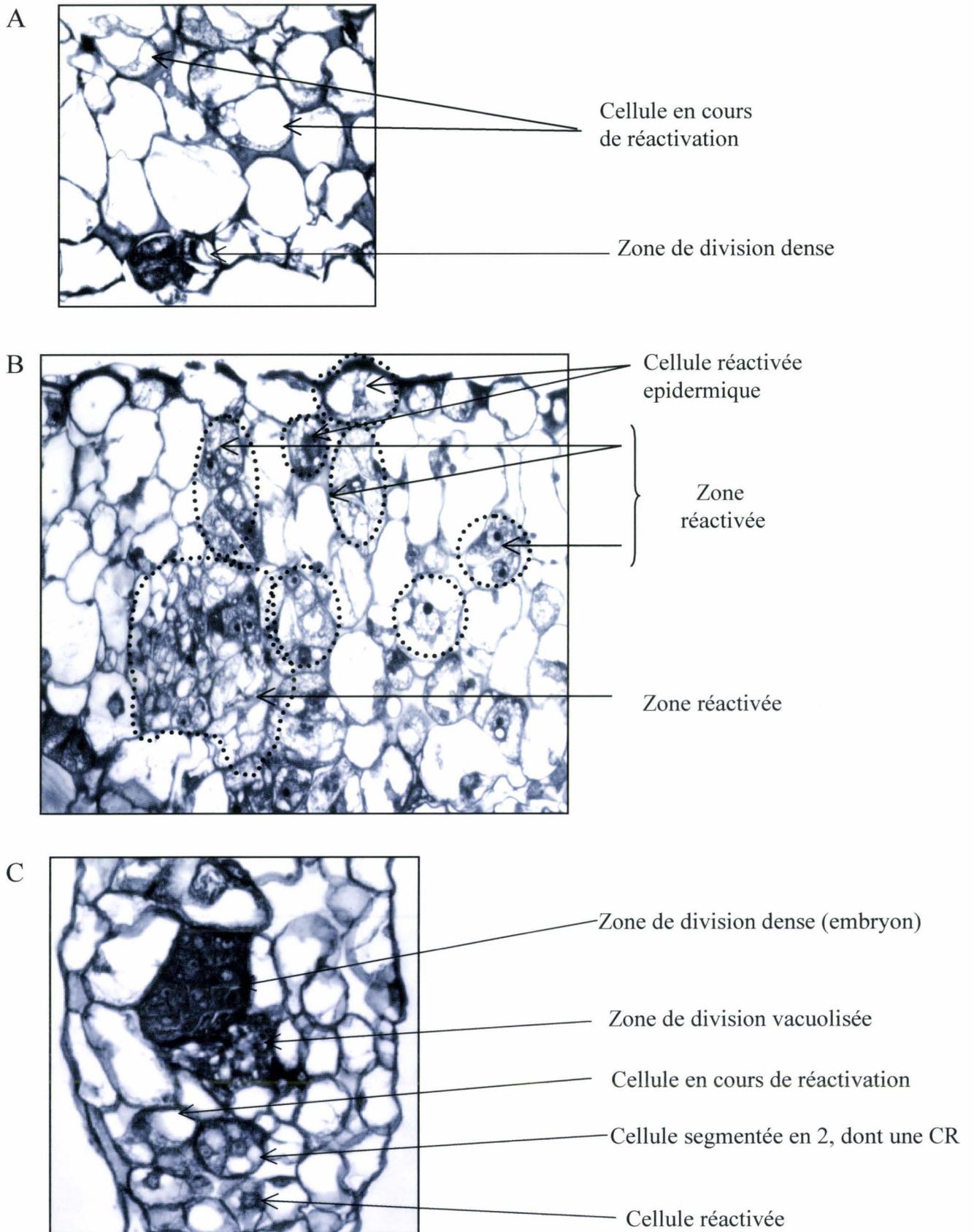


Figure 59: Référentiel des figures de réactivation observées au cours de cultures embryogènes

A: cellule en cours de réactivation

B: Cellule réactivée dans des zones réactivées

C: Zone de division dense et zone de division vacuolisée

Résultats : Observations cytologiques

Les observations préliminaires de notre nouveau matériel ont permis de mettre en évidence de nouvelles classes de figures cytologiques encore jamais observées. L'établissement d'un référentiel nous a alors permis de classer ces nouveaux événements. Ce référentiel décrit les classes communes à l'hybride "474" et aux nouveaux génotypes, et les nouvelles classes recensées chez les génotypes K59 et C15. Des photographies présentant ce référentiel sont présentées sur la figure 59.

La première classe recensée est la classe des CER (Figure 59 A). Ces CER sont caractérisées par la présence d'un noyau pariétal visible qui commence à gonfler et qui présente un nucléole dont le diamètre est inférieur à 2,5 μm .

La seconde classe recensée est celle des CR qui regroupe différents états autour de la figure classique à noyau central (Figure 59 B). Cette fenêtre caractérise donc l'étape de réactivation qui est représentée par plusieurs événements cellulaires. La CR est caractérisée par un noyau rond qui migre vers le centre de la cellule et qui présente, après coloration au bleu de toluidine, une enveloppe colorée. Dans le noyau, un, deux ou trois nucléoles dont le diamètre est compris entre 2,5 et 5 μm sont visibles et la chromatine présente une coloration bleue unie. La chromatine des ces CR va ensuite montrer différents stades de modification de structure, comme des amas de chromatine apparaissant comme des têtes d'épingles. Ces condensations vont ensuite prendre l'aspect de "spots" puis de pointillés jusqu'à la disparition complète du nucléole. La densité du cytoplasme est augmentée dans ces cellules. La cellule est alors au stade préprophase. Cette classe était aussi caractéristique de la réactivation de l'hybride "474" (Blervacq *et al.*, 1995), mais on observe une migration du noyau vers le centre de la cellule moins importante chez le génotype K59. Cette différence avait aussi été constatée chez les plantes de la variété Pévèle capables de produire quelques CR en conditions embryogènes (Batel, 2000).

Les CR sont donc caractérisées par un noyau central, une vacuole fragmentée et des trabécules cytoplasmiques.

Un autre état caractéristique de ces CR est une migration des plastes autour du noyau devenu volumineux. On aura alors un noyau muni d'une couronne chloroplastique. Dans un stade ultime de CR, les chloroplastes ont disparu et la CR va se diviser. La division de la CR va engendrer l'établissement de deux classes qui sont les zones de division dense (ZD) et les zones de division vacuolisée (ZV). Ces classes sont établies en fonction de critères de description cytologique.

Résultats : Observations cytologiques

Chez l'hybride "474", l'embryon somatique avait un mode de division par segmentation de type cytoplasmique dense qui serait l'équivalent des ZD observées chez le génotype K59 (Figure 59 C). Ce mode de division permettait la production de deux classes de structures puisque des embryons somatiques, mais aussi des bourgeons, étaient observés *a posteriori* dans les coupes. En effet, la mise en place de bourgeons nécessite la présence d'un massif méristématique dense.

Une classe nouvelle observée chez les nouveaux génotypes regroupe des divisions qui se réalisent suivant une segmentation de type cytoplasme vacuolisé (ZV) (Figure 59 C). Dès la première division en deux cellules filles, les cytoplasmes présentent de grandes vacuoles. Des observations au onzième jour de culture de fragments foliaires ont confirmé la présence de ces ZV. En effet, les cellules présentent un vide optique, c'est à dire un vacuome encore largement représenté, et un noyau actif. Les modalités de division sont de type inorganisé. Il a pu être observé au sein d'une ZV une zone qui était dans un premier temps vacuolisée et qui présente des cellules filles plus petites et plus denses qui représenterait une embryogenèse somatique secondaire (Blervacq, communication personnelle).

La question qui se pose alors est le devenir des ces ZD et ZV chez le génotype K59. Les ZD deviennent-elles de manière exclusive des embryons et des bourgeons et quel est le devenir des ZV ? Pour répondre à cette question, il faudrait réaliser des observations cytologiques sur les feuilles et les racines dans les jours très tardifs de la cinétique de culture.

2.3. Méthode de comptage

Pour les comptages réalisés en pourcentage de cellules réactives observées par coupe, il a fallu estimer la surface observée et le nombre de cellules observées par unité de surface. La surface des explants foliaires a été estimée par le calcul de l'aire d'un rectangle. La surface des coupes racinaires observées a été évaluée par le calcul de la surface d'un cercle auquel on a soustrait la surface du cercle de la stèle (qui en général ne présente pas de figure cytologique d'intérêt). Le volume moyen d'une cellule a été estimé pour la feuille ou la racine et la surface obtenue a été divisée par la surface d'une cellule. Le nombre de figures de réactivation observé par organe et par jour de culture a alors été converti en pourcentage de cellules corticales (racine) ou mésophylliennes (feuille) présentes par coupe. Concernant les

	K59 F+ gly	K59 F- gly	K59 R	C15 F	C15 R
Nombre de coupe par jour	15	15	10	14	40
Nombre de plante observé	1	1	4	5	5

	C8 F J4	C14 F J4	C15 F J4	C7 FJ4	K59 F J4
Nombre de coupe par jour	35	39	36	32	20

Tableau 1: Récapitulatif des nombres de coupes observées pour chaque série de comptage
 F : Feuille + Gly : présence de glycérol 330 mM dans le milieu
 R : Racine - Gly : absence de glycérol dans le milieu

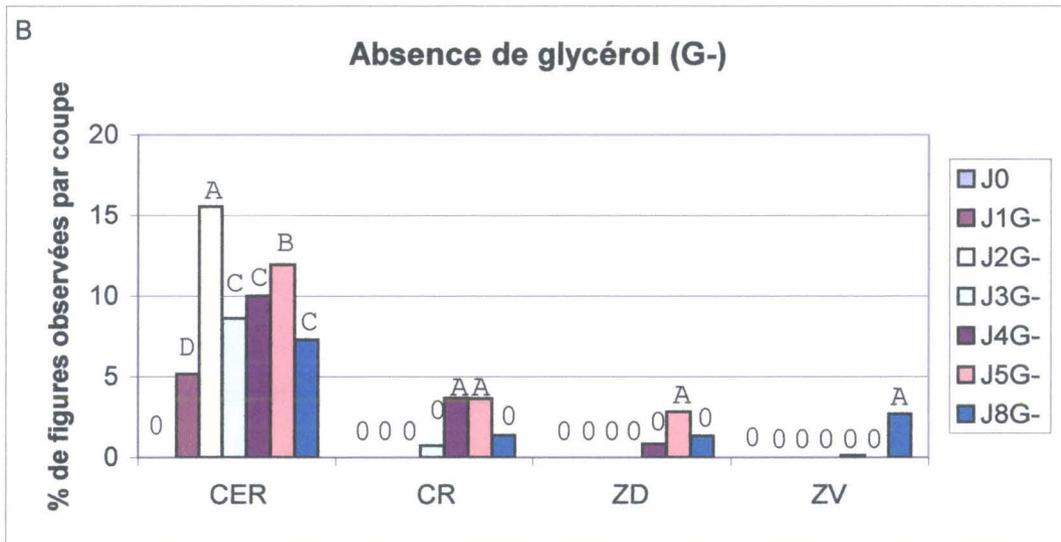
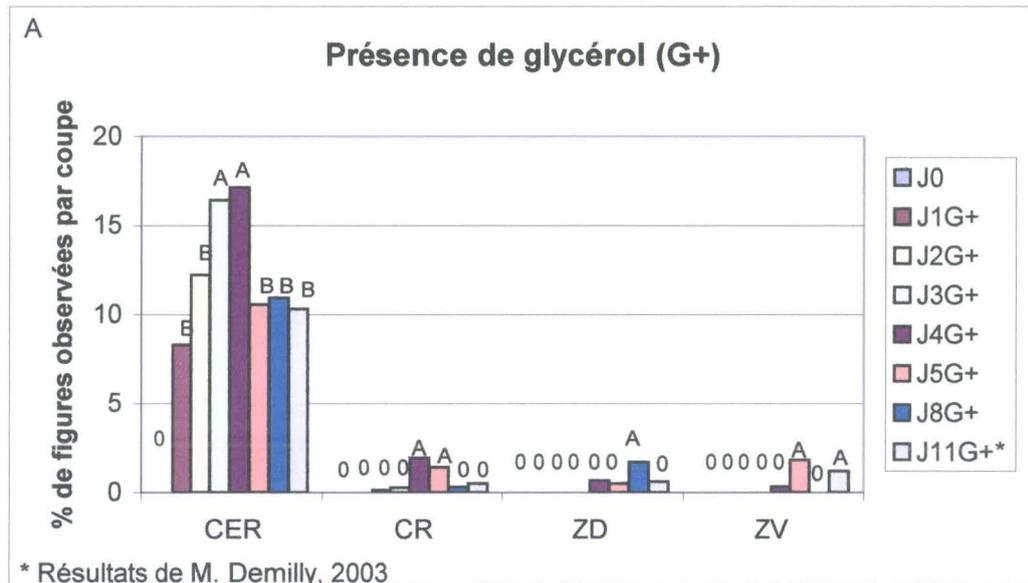


Figure 60 : Comparaison des figures de réactivation obtenues après culture en conditions embryogènes de fragments foliaires du génotypes K59 en présence (G+) (A) et en absence (G-) de glycérol (B).

Pour chaque type de figures cytologiques, les différences significatives entre les jours ont été déterminées avec le test de Student-Newman-Keuls. Chaque jour ayant une lettre différente de celle d'un autre jour est significativement différent de ce dernier, au seuil de 5%.

comptages foliaires, les zones de coupures ont été exclues. En effet, ces zones soumises au stress de la coupure répondent plus fortement que les autres parties de la feuilles.

Trois coupes de 5 μ m ont été déposées sur une lame. Les trois coupes suivantes ont été prélevées après avoir coupé sur un espace de 500 μ m (100 coupes). Les racines et les feuilles ont été coupées de manière transversale. En moyenne par gélule, les comptages ont été réalisés à partir de 1 ou 2 explants foliaires et 5 ou 6 explants racinaires.

Le nombre de coupes par jour de culture et le nombre de plantes testées sont récapitulés dans le tableau 1.

2.4. Comparaison des figures de réactivation observées chez le génotype K59 cultivé en absence ou en présence de glycérol.

Les premiers résultats concernant la relative synchronisation par le glycérol des évènements précoces de l'embryogenèse somatique ont été réalisés en 1992 sur l'hybride "474" (Robatche-Claive *et al.*, 1992). Ce traitement par le glycérol était réalisé dans le milieu d'induction contenant 30 mM de saccharose et 330 mM de glycérol pendant cinq jours. Le prétraitement de 5 jours dans un milieu renfermant du glycérol, en plus du saccharose, permet de synchroniser la phase d'induction. La première division des cellules réactivées est alors retardée jusqu'au cinquième jour de culture. En effet, 3 jours après le transfert des feuilles dans le milieu d'expression dépourvu de glycérol, les cellules réactivées représentent plus de 70% de la population des cellules induites et les petits embryons représentent 25% des cellules induites.

De plus, la présence de glycérol dans le milieu de culture provoque l'induction d'un grand nombre d'embryons. Après le transfert sur milieu d'expression (dépourvu de glycérol), le nombre total d'embryons par coupe augmente de façon spectaculaire entre le 3^{ème} et le 5^{ème} jour : le facteur de multiplication est égal à 12 fois. Entre le 5^{ème} jour et le 7^{ème} jour, ce nombre augmente encore mais moins vite (facteur de multiplication de 1,8). De plus, le développement des embryons induits en présence de glycérol est meilleur et le taux de développement ultérieur est plus élevé (Dubois, communication personnelle).

Quand les feuilles sont cultivées en absence de glycérol, les premiers embryons se forment après deux ou trois jours de culture. Au 5^{ème} jour de culture, on observe aussi des cellules réactivées en proportion importante (70% des évènements dénombrés), mais on observe des embryons de toutes les tailles.

Résultats : Observations cytologiques

Après ces résultats, le milieu utilisé pour induire l'embryogenèse somatique chez le génotype "474" est devenu le suivant : milieu d'induction comprenant 30 mM de saccharose (10g/litre) et 330 mM de glycérol. On parle alors d'une relative synchronisation de la première division des cellules embryogènes par le glycérol.

Ce milieu de culture a ensuite été modifié pour augmenter le rendement en protéines, dans l'objectif de réaliser des électrophorèses en deux dimensions des protéines extracellulaires. La quantité de saccharose a alors été doublée dans les milieux d'induction et d'expression. Des analyses cytologiques ont été réalisées, toujours chez l'hybride "474", pour vérifier l'effet du glycérol en présence de plus de saccharose (Belletre *et al.*, 1999). Le doublement de la quantité de saccharose a eu pour effet d'augmenter le rendement en embryons somatiques : $14,71 \pm 0,28$ contre $9,58 \pm 0,54$ embryons somatiques par mm^2 de feuilles. De plus, le retard de première division jusqu'au 5^{ème} jour n'était plus maintenu que jusqu'au 4^{ème} jour de culture. Au vue de ces résultats, de nouvelles conditions de culture des fragments foliaires ont alors été définies : les fragments étaient cultivés pendant 4 jours dans un milieu d'induction contenant 60 mM de saccharose et 330 mM de glycérol puis transférés dans un milieu d'expression contenant 60 mM de saccharose.

Le but de notre expérience a alors été de vérifier si le glycérol a toujours un effet de retard sur la première division des cellules embryogènes du génotype K59.

Des fragments foliaires du génotype K59 ont été cultivés pendant 4 jours sur un milieu M17 additionné de glycérol (J1 à J4) et transférés sur un milieu dépourvu de glycérol pour la suite de la culture (J5 à J11). De même, des fragments ont été cultivés pendant la même période et en conditions identiques dans un milieu dépourvu de glycérol. Aux différents jours de culture, des fragments foliaires ont été prélevés et les figures de réactivation ont été observées et comptées. Le J0 représente le stade précédant la mise en culture.

Les résultats sont présentés sur la figure 60. Par analyse de variance, il a été possible de comparer les pourcentages d'apparition des différentes figures cytologiques entre les différents jours de culture intra-cinétique, c'est à dire en absence et en présence de glycérol. Chez le génotype K59, des cellules en cours de réactivation (CER), des cellules réactivées (CR) et des zones denses (ZD) sont observées dans les deux conditions. Quelques zones de divisions vacuolisées sont observées à partir du quatrième jour de culture chez les fragments cultivés pendant quatre jours en présence de glycérol et au huitième jour pour la culture en absence de glycérol.

Des CER sont observées tout au long de la culture dans les deux conditions. La différence notable est une différence d'accumulation de ces cellules. En effet, en présence de

Résultats : Observations cytologiques

glycérol (Figure 60 A), les CER apparaissent progressivement avec un pic d'accumulation au troisième et quatrième jour de culture (≈ 16 % des cellules observées), puis leur nombre diminue et se stabilise pendant la fin de la culture. Ce profil d'accumulation est semblable pour les CR qui s'accumulent à partir du troisième et quatrième jour de culture (≈ 2 % des cellules observées) puis leur nombre n'est plus significativement différent de zéro jusqu'à la fin de la culture.

En absence de glycérol (Figure 60 B), le profil d'accumulation des CER est différent. En effet, le pic de CER est observé au second jour de culture (≈ 15 % des cellules observées) puis la proportion de CER diminue significativement au troisième jour de culture pour augmenter en un second pic au cinquième jour de culture (≈ 12 % des cellules observées). Il semble que le profil d'accumulation des CER présente deux vagues. Des CR sont observées au quatrième et cinquième jour de culture (≈ 4 % des cellules observées), ce jour de culture correspondant à la baisse significative du nombre des CER. Le nombre de CR n'est plus significativement différent de zéro au huitième jour de culture.

Dans les deux conditions de culture, des ZD sont observées. En présence de glycérol, des ZD sont observées de façon significative seulement au J8. En absence de glycérol, ces ZD sont observées à partir du cinquième jour de culture. La baisse du nombre de ZD à J8 est probablement due à un problème d'échantillonnage. Des ZV sont comptées dans les deux conditions de façon significative à J5 en présence de glycérol et à J8 en absence de glycérol.

Ces résultats montrent que la présence de glycérol permet une accumulation maximale des CER à J3 et J4 alors que la maximum est obtenu à J2 en absence de glycérol. Le glycérol retarde donc l'apparition du pic des CER. Par contre, il n'y a pas de différence pour la période d'obtention des CR, à J4-J5 en présence et absence de glycérol, mais on en obtient deux fois plus en absence de glycérol. Une hypothèse proposée est que la présence du glycérol, osmoticum dans le milieu de culture est capable de bloquer les dimères α et β de tubuline, retardant ainsi la migration des noyaux en position centrale dans la cellule. De plus, on peut noter la présence de ZD à J5 en absence de glycérol alors que les premières ZD sont observées en présence de glycérol à J8. La conclusion est identique à celle faite précédemment : la vitesse d'évolution des CER en CR puis en ZD est plus rapide en absence de glycérol. Ces conclusions ne sont plus vraies pour les ZV qui sont présentes au cinquième jour en présence de glycérol et au huitième jour en absence de glycérol.

Il faut noter que seulement une partie des cellules qui entrent en réactivation (CER) sont capables de donner des CR.

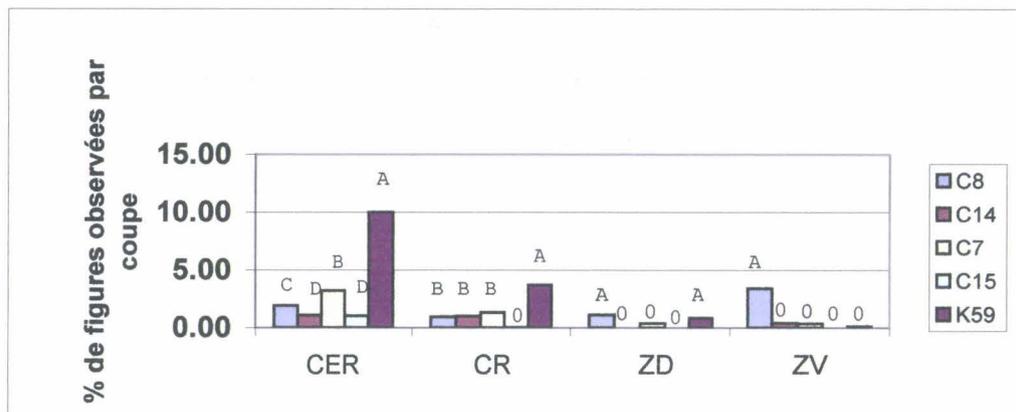


Figure 61 : Comparaison des figures de réactivation obtenues après quatre jours de culture des fragments foliaires des différents génotypes C8, C14, C7, C15 et K59.

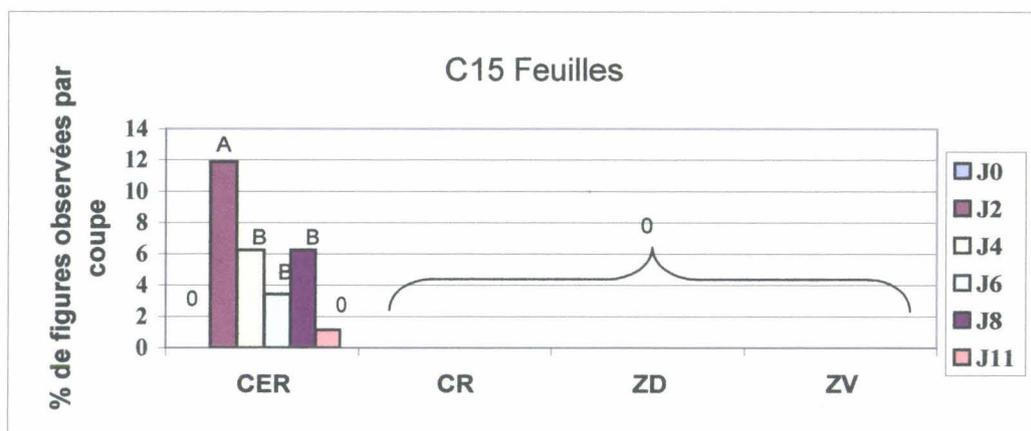


Figure 62 : Comparaison des figures de réactivation en fonction des jours de culture de fragments foliaires du génotype C15 en absence de glycérol.

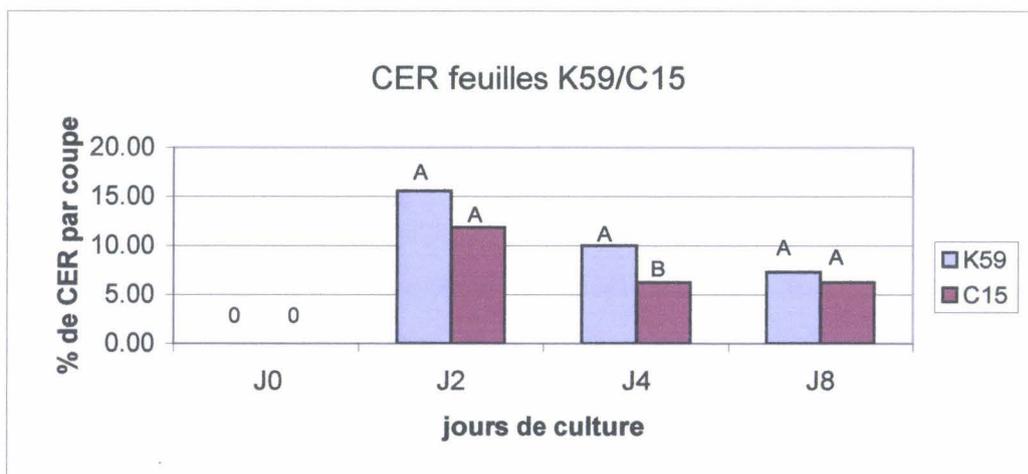


Figure 63 : Comparaison du nombre de CER obtenues chez les génotypes K59 et C15 après culture de fragments foliaires en condition embryogène en absence de glycérol.

Pour chaque type de figures cytologiques, les différences significatives entre les jours (Figure 62 et 63) ou entre les génotypes (Figure 64) ont été déterminées avec le test de Student-Newman-Keuls. Chaque jour ou génotype ayant une lettre différente de celle d'un autre jour ou génotype est significativement différent de ce dernier au seuil de 5%.

2.5. Observation des figures de réactivation de fragments foliaires au quatrième jour chez des génotypes issus de l'autofécondation de K59.

Ces observations cytologiques ont été réalisées sur des coupes de fragments foliaires mis en culture 4 jours sur un milieu M17S20 dépourvu de glycérol, dans le but de caractériser les nouveaux génotypes disponibles, et ainsi de pouvoir choisir le matériel le plus et le moins réactivable (au quatrième jour) pour l'étude de l'expression de nos gènes candidats. La finalité était de trouver, éventuellement un autre génotype embryogène, mais surtout un génotype proche génétiquement de K59, pouvant être utilisé comme témoin non embryogène. Vingt plantes issues d'autofécondation de K59 ont été évaluées par dénombrement des embryons somatiques après culture de racines et de feuilles 30 jours en condition embryogène (10 jours en milieu d'induction M17S60 puis 20 jours en culture dans un milieu H5 liquide (Annexe 2) à la lumière et sous agitation). Des embryons ont été observés en nombre plus important pour les génotypes K59 et C7, moins pour le génotype C8 et aucun embryon n'a été observé chez les génotypes C14 et C15.

Des fragments foliaires de ces cinq génotypes ont donc été mis en culture pendant quatre jours en condition embryogène et sans glycérol. Des coupes transversales de fragments foliaires ont été réalisées et observées.

Les résultats de cette étude sont présentés sur la figure 61. La première observation est que ces cinq génotypes sont réactivables, puisque l'on observe des CER chez les cinq génotypes. Cependant, les fragments foliaires K59 sont les plus réactivables. En effet, 10% des cellules sont en cours de réactivation au quatrième jour. Les génotypes C7, C8 et les génotype C14 et C15 montrent des quantités décroissantes de CER. De même, le génotype K59 permet l'obtention du maximum de CR (4%). Les génotypes C8, C14 et C7 produisent statistiquement la même quantité de CR (environ 1%) et le génotype C15 ne présentent pas de CR. Si on groupe le nombre des CER et des CR pour chacun des génotypes, le génotype présentant le plus de CER + CR reste le K59, puis les génotypes C7, C8, C14 et C15 (cet ordre est quasiment le même que pour la quantité de CER).

Le devenir de ces CR est pour nous le point d'étude le plus intéressant puisque qu'il détermine la capacité réelle à l'embryogenèse somatique de nos génotypes. Des ZD que l'on peut rapprocher qualitativement de l'embryon somatique sont observées chez les génotypes K59 et C8 en quantité identique. Le pourcentage obtenu chez le génotype C7 n'est significativement pas différent de 0 dans cette expérience. Des ZV ne sont observées de façon

significative que pour le génotype C8. Le génotype C15 ne présente pas du tout de ZV. Le génotype le plus embryogène est le génotype K59, puisqu'il présente le plus de CR à ce stade de la culture, produit des ZD de façon significative et ne présente pas de ZV, du moins à J4. Des embryons n'ont jamais été observés sur les cultures menées à 30 jours chez les génotypes C14 et C15. Ce résultat est confirmé après l'observation des coupes cytologiques. Le génotype C15 est alors choisi comme témoin non embryogène. Le génotype embryogène choisi reste K59 puisque, même si le génotype C8 permet l'obtention de plus de ZD, d'autres évènements de division (ZV) sont aussi observés dans des proportions importantes (3,5%).

2.6 Caractérisation des figures cytologiques observées au cours de la culture de fragments foliaires du génotype C15.

De manière à comparer les résultats observés au cours de la culture de fragments foliaires du génotype embryogène K59, une étude en cinétique a été réalisée chez le génotype non embryogène C15, cultivé en absence de glycérol.

Les résultats sont présentés sur la figure 62. Aux différents jours de la culture, seules des CER sont observées avec le maximum observé à J2 de la cinétique comme pour le génotype K59. Aux jours suivants de la cinétique, des CER sont observées dans proportion plus faible aux J4, J6 et J8 et dans une proportion non significative au J11. Aucune CR n'est observée. Les résultats observés à J4 dans l'expérience précédente sont donc confirmés ici. Le génotype C15 semble être le mieux adapté pour représenté le matériel non embryogène.

Si l'on compare les résultats obtenus chez les génotypes C15 et K59 pour les CER, il existe une différence statistique à J4 de la culture en condition embryogène (Figure 63) où l'on observe plus de CER chez le génotype K59 que chez le génotype C15. Par contre, à J2 et à J8, on obtient la même proportion de CER chez les deux génotypes.

Cette capacité à initier la réactivation cellulaire chez le génotype C15 est sans doute à mettre en relation avec les conditions de cultures des fragments foliaires. Des stress mécaniques et thermiques sont appliqués pendant la coupure et la culture et provoquent certainement un début de réactivation de cellules. Dans ce cas, toutes les chicorées sont probablement capables de produire des CER. De plus, nous avons observé dans de très rares cas des CER dans un tissu non induit, ce qui suggère un potentiel de réactivation de tous les génotypes.

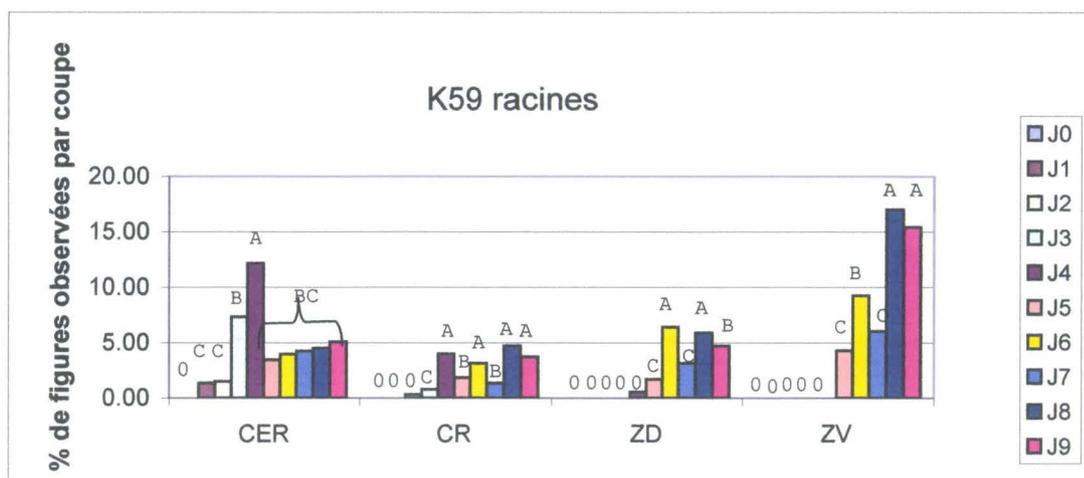


Figure 64: Caractérisation des figures cytologiques observées au cours de la culture de fragments racinaires du génotype K59 en condition embryogène en absence de glycérol.

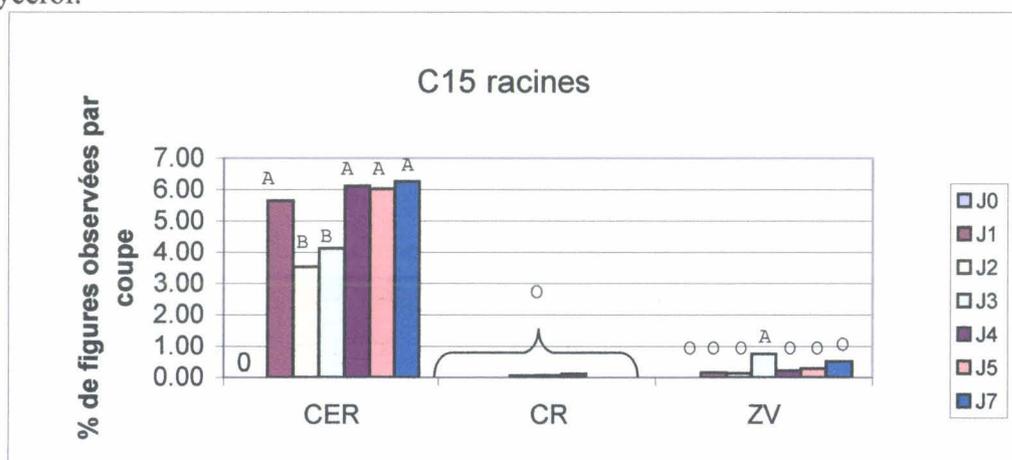


Figure 65: Caractérisation des figures cytologiques observées au cours de la culture de fragments racinaires du génotype C15 en condition embryogène en absence de glycérol.

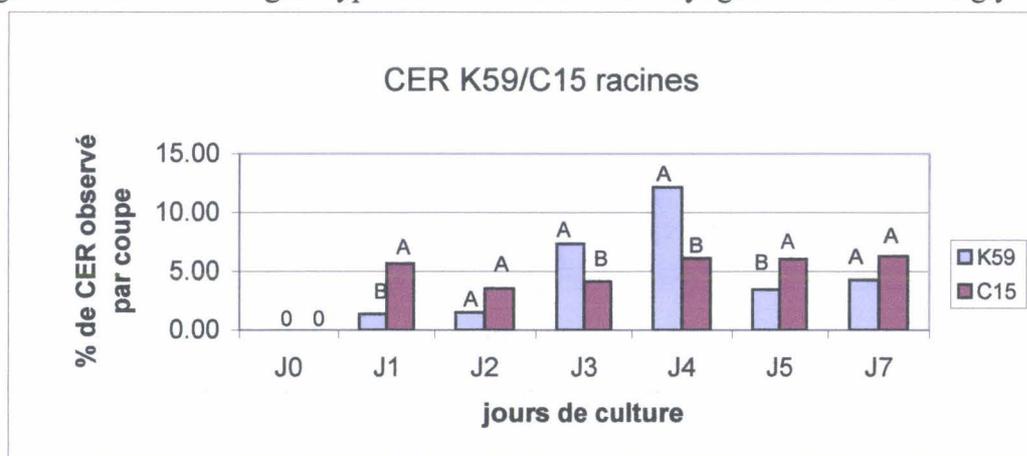


Figure 66: Comparaison du nombre de CER obtenues chez les génotypes K59 et C15 après culture de fragments racinaires en condition embryogène en absence de glycérol.

Pour chaque type de figures cytologiques, les différences significatives entre les jours (Figure 65 et 66) ou entre les génotypes (Figure 67) ont été calculées avec le test de Student-Newman-Keuls. Chaque jour ou génotype ayant une lettre différente de celle d'un autre jour ou génotype est significativement différent de ce dernier au seuil de 5%.

2.7. Caractérisation des figures cytologiques observées au cours de la culture de fragments racinaires du génotype K59 en absence de glycérol.

Afin de réaliser une étude cytologique la plus exhaustive possible, des fragments racinaires ont été cultivés dans un milieu dépourvu de glycérol pendant 9 jours et des observations ont été réalisées tous les jours de la cinétique. Les résultats sont présentés sur la figure 64.

Tout au long de la culture, des CER sont observées. Le nombre de CER augmente jusqu'à atteindre un pic au 4^{ème} jour de culture. La population de CER diminue au cinquième jour et reste constante jusqu'à la fin de la culture.

Des CR sont visibles en faible nombre à partir du 3^{ème} jour de culture et présentent un pic d'accumulation le quatrième jour, ce qui est identique à la culture de fragments foliaires dans les mêmes conditions. Le pourcentage des CR reste assez constant tout au long de la culture.

Les premières divisions amenant à des ZD sont visibles le 5^{ème} jour de culture, leur nombre augmente le 6^{ème} jour, et reste plus ou moins stable jusqu'à la fin de la cinétique.

L'accumulation des ZV présente la même profil : une augmentation significative le 6^{ème} jour et une seconde augmentation plus importante le 8^{ème} jour de culture.

Il semblait alors intéressant de comparer les résultats obtenus après culture de feuille et de racines du génotype K59 dans les mêmes conditions. En ce qui concerne les CER, les résultats ne sont pas très différents pour les racines et les feuilles. Le pic de CER pour les feuilles est obtenu à J2 ($\approx 15\%$) alors que le pic de CER est obtenu à J4 ($\approx 12\%$) pour les racines. Par contre, on observe des CR tout au long de la culture des fragments racinaires de façon significative à partir du troisième jour de culture, alors que les fragments foliaires ne montrent de CR de façon significative qu'au troisième et quatrième jour. Il y a donc plus de CR dans les fragments racinaires du génotype K59. Ces observations expliquent alors les résultats observés pour les ZD et les ZV qui sont observées en proportions plus importantes et sur une plus longue durée dans les fragments racinaires. En effet, les fragments racinaires montrent significativement plus de ZD qui apparaissent du J5 au J8 de culture et significativement plus de ZV au J5 et qui augmente jusqu'aux J8 et J9 ($\approx 15\%$ des cellules observées)

Génotypes		K59 Parent	C7	C8 Autofécondation de K59	C14	C15
Feuilles	CER	+++++	++	++	+	+++
	CR	+++	+	+	+	-
	ZD	+++	-	+	-	-
	ZV	++	-	+	-	-
Racines	CER	+++++				++++
	CR	++++				-
	ZD	++++				-
	ZV	++++				-

Choisi comme génotype embryogène
Choisi comme génotype non embryogène

Tableau 2 : Récapitulatif des capacités des différents génotypes à produire des CER, des CR, des ZD et des ZV

2.8. Caractérisation des figures cytologiques observées au cours de la culture de fragments racinaires du génotype C15 en absence de glycérol.

Pour caractériser le nouveau matériel considéré comme non embryogène, des cultures de racine du génotype C15 ont été réalisées dans les mêmes conditions que pour le génotype K59. Des coupes et des observations ont été réalisées aux différents jours de la cinétique. Les résultats sont présentés sur la figure 65.

Des CER sont obtenues dès le premier jour de culture ainsi que sur la période J2-J7. Par contre, on observe moins de CER au 2^{ème} et 3^{ème} jours de culture. Ce résultat est un peu surprenant et l'échantillonnage est peut-être à remettre en cause pour ce comptage.

Des CR et des ZD ne sont jamais obtenues de façon significative quel que soit le jour de culture. Des ZV sont observées de façon significative le 3^{ème} jour de culture mais restent une proportion faible des cellules (moins de 1%).

Si l'on compare les résultats obtenus chez le génotype K59 et chez le génotype C15 par une analyse statistique (figure 66), le pourcentage de CER observé chez le génotype C15 est constant tout au long de la culture, sauf à J2-J3. Ce résultat reste à confirmer par l'observation d'autres échantillons. Chez le génotype K59, on observe un pic d'apparition de CER à J4.

Ces résultats confirment les résultats obtenus pour les feuilles. Le génotype C15 est capable d'initier la réactivation de certaines cellules mais leur évolution en CR puis en ZD semble bloquée. Ce génotype semble être un matériel qui présente les caractéristiques nécessaires pour être choisi comme témoin non embryogène. Un tableau récapitulatif des capacités des deux génotypes à produire les différentes figures de réactivation est proposé (Tableau 2).

Après ces études de l'embryogenèse zygotique puis de l'embryogenèse somatique, nous nous sommes intéressés au profil d'expression des gènes *CiCLV1p* et *CiSTM*, précédemment caractérisés chez la chicorée, au cours des phases de développement des embryons zygotiques et de l'induction de l'embryogenèse somatique.

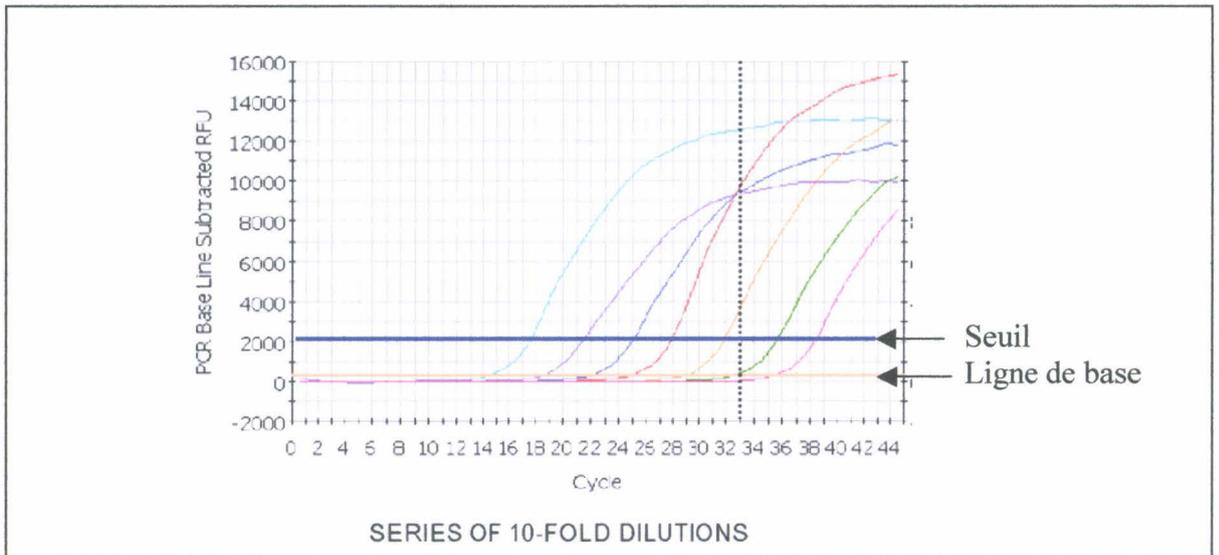


Figure 67 : Amplification d'un échantillon dilué 10 fois en série

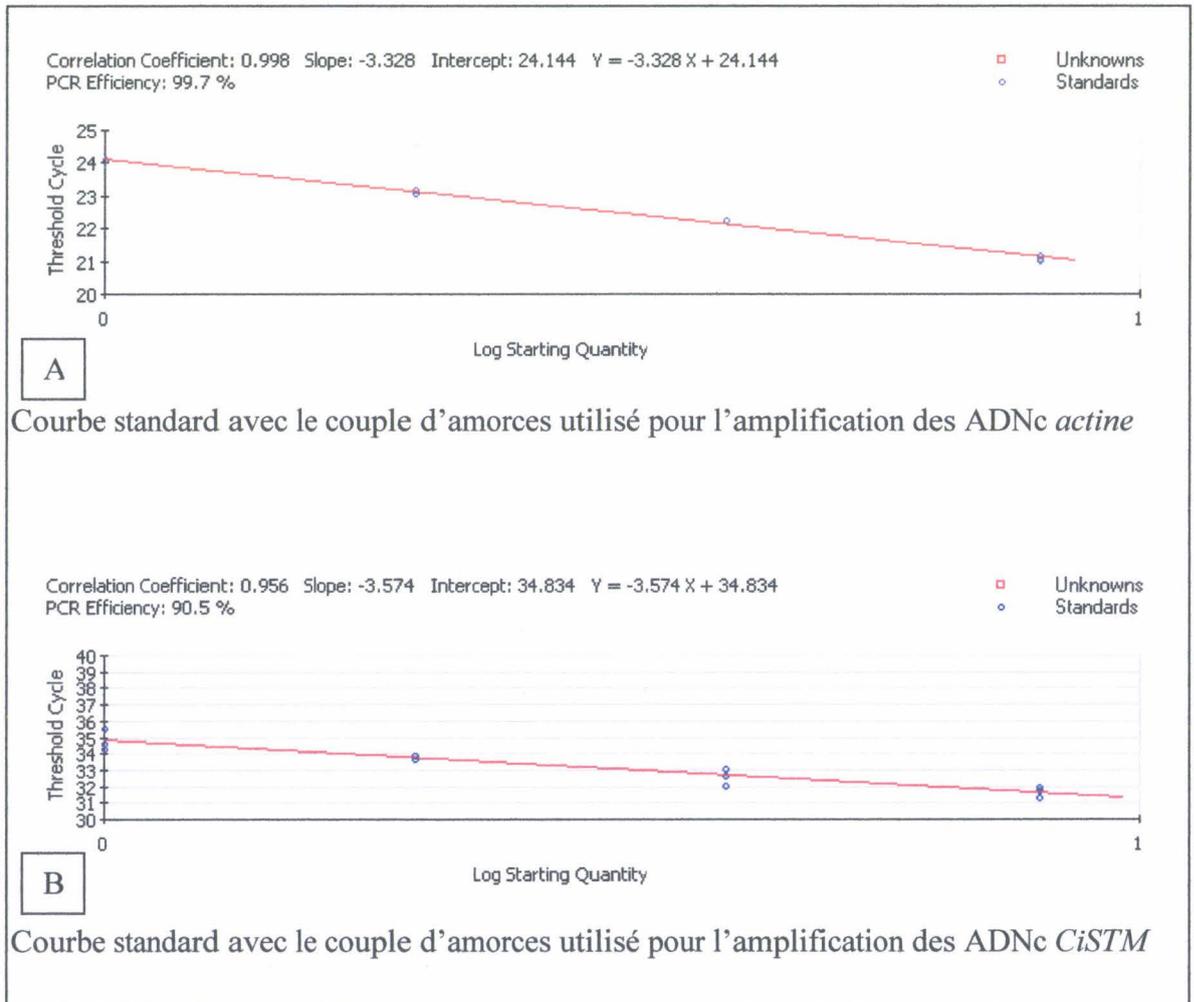


Figure 68 : Exemples de courbes standard

3. Etude du profil d'expression des transcrits *CiCLV1p* et *CiSTM* par RT-PCR en temps réel.

3.1. Analyse des résultats

L'analyse des résultats de RT-PCR en temps réel nécessite plusieurs étapes qui doivent être réalisées après chaque amplification.

- Etablissement du Ct.

La première étape est l'établissement du Ct (Cycle threshold : cycle seuil). La figure 67 représente les profils d'amplification obtenus pour un échantillon dilué en série 10 fois. Si l'on stoppe l'amplification à 33 cycles et que l'on dépose les échantillons sur gel d'agarose contenant du bromure d'éthidium, les réactions rouge, bleu et violet présentent les mêmes quantités de produit, même si au départ il existait un facteur 100 entre les quantités d'ADN initiales des réactions violet et rouge. Ces résultats indiquent bien que l'analyse des produits de PCR sur gel d'agarose n'est pas quantitative.

La quantification de matrice initiale dans le tube doit être faite quand la réaction d'amplification est exponentielle, ce qui se produit au début de la réaction. Un seuil est alors défini par l'utilisateur, qui correspond à 10 fois l'écart type associé à la moyenne des points de la ligne de base. Ce seuil est matérialisé par le trait bleu sur la figure 67, il coupe la courbe d'amplification en un point et la projection de ce point sur l'axe des abscisses définit le Ct qui est le nombre de cycles d'amplification à partir duquel la fluorescence est significativement supérieure au bruit de fond. Il faut noter que le Ct est proportionnel à la quantité de matrice au départ. Plus le Ct est bas, plus le tube contenait de matrice avant l'amplification. Au delà d'une certaine valeur de Ct, nous considérons que les niveaux d'expression ne sont plus suffisants pour être quantifiables de manière correcte, même s'ils sont détectables.

- Réalisation des courbes standard

Dans notre étude, nous avons utilisé une méthode de quantification relative. Dans ce cas, un gène contrôle est amplifié parallèlement au gène cible. Les comparaisons d'expression relative du gène sont valables si le gène contrôle est exprimé de façon constitutive. La quantification des ARN cibles peut alors être normalisée par rapport à celle du contrôle. Les

Résultats : Etude du profil d'expression des transcrits *CiCLV1* et *CiSTM*

témoins souvent utilisés sont les gènes *18S*, de *β actine* ou de *GAPDH* (Glycéraldéhyde-3-Phosphate Déshydrogénase).

Pour débiter une amplification, la première étape est de valider le couple d'amorces par une courbe standard qui permettra de définir l'efficacité de la PCR. Pour cela, on réalise une gamme de dilution des produits de RT (1/15, 1/30, 1/60, 1/120). Dans notre cas, l'échantillon initial est issu d'un mélange de produits de RT aux différents points de la cinétique. Pour chaque point de dilution la réaction est répétée trois fois. Pour chaque échantillon, on détermine les Ct. A ce seuil, dans les différents tubes, la même quantité de produit est obtenue avec des nombres de cycles différents. Une droite est alors tracée. Elle représente le logarithme du facteur de dilution en fonction du Ct obtenu. Deux facteurs importants seront pris en compte à partir de cette droite : il s'agit du coefficient de corrélation (qui mesure la qualité de la régression et qui doit être le plus proche possible de 1) et de la pente de la droite. La pente de la droite permet de calculer l'efficacité (E) de la PCR (Pfaffl, 2001) selon la formule suivante :

$$1+E = 10^{(-1/\text{pente})}$$

Deux exemples de courbe standard sont représentés sur la figure 68. Le premier exemple (A) concerne la validation du couple d'amorces utilisé pour l'amplification du contrôle *actine*, le second exemple (B) celle du couple d'amorces utilisé pour l'amplification des ADNc *CiSTM*. Dans les deux cas, les efficacités sont supérieures à 90% et les coefficients de corrélation supérieurs à 0,95.

Suite à cette étape de validation des couples d'amorces, les amplifications peuvent être réalisées à partir des différents échantillons pour les gènes cibles et contrôles.

- Quantification relative du niveau d'expression des transcrits par la méthode du $\Delta\Delta\text{Ct}$.

Cette méthode est une méthode relative de comparaison du niveau des transcrits du gène cible par rapport au niveau des transcrits de gènes contrôles qui s'expriment de façon constitutive au cours des différents jours de la cinétique. Pour appliquer cette méthode, il est indispensable que les efficacités d'amplification de la cible et du contrôle soient identiques et les plus proches possible de 100% (cf figure 68).

AAGTTAAGTTGAAACCCCTTGAAAGAGAAATGGATGGCGGTGGTGTAGGTACATCATGTTTGGATGGGGTTT
GGAGAAAACAACAGCATTAAATCGAGGCGGTAGTAGTGATAATAATAACAGCATTGGATCAGTGTCTTCC
TCCACCTCCTGTTATATACAACAACANGGTAATTTTTTCCACTCAGGACCATCATCATCATAGCAACTGTG
GGACTTCAGCTTCTGCTACGATGCTTGAAGACAACAACAACAGCATTAAACGATGGAGGAGGCTTAGGC
TTCATCTCATCGTCATCATGTTCTTCATCTGTTAAAGCGAAGATCATGTCTCATCCCCATTACCCCTCGTCT
CCTATCAGCTTATCTGAATTGCCAAAAGGTAGGGGCACCACCTGAAGTAGTGGAACGACTAGAAGAAGCTT
GCCGAGCGTCAGTGATGGCTGCCATGTCCGGTCGTTCCGGCTCTGGTGGCAGCGGTGGAGGTATGAGCACG
AGCATTGTCCGACAAGATCCGGCTCTTGATCAGTTCATGGAAGCTTACTGTGAAATGCTAATTAATATGA
ACAAGAACTCTAAAACCCCTCAAGGAAGCCATGCTTTTTCTGTCAAGGATCGAGTCACAGTTCAAGGCCA
TCTCTTTTTCTGCCCTCGGATTCGGTTGTGGGGATGGAGGCATGGATAGGAACGGGTTCATCTGAAGAAGAT
CTGGATGTTGATGTTAATAACAATATGGTTGATCCTCAAGCTGAAGAGAGGGAGCTGAAAGGTGAGTTATT
GCGCAAGTACAGTGGGTATTTAGGAAGTCTGAAGCAGGAGTTTATGAAGAAGAGAAAAAAGGGAAGTTGC
CCAAAGAAGCTCGTCAACAGTTGCTTGACTGGTGGACCAGACATTACAAATGGCCGTACCCATCGGAAGCT
CAGAAGTTGGCTCTAGCT**TGAATCCACAGGGCTAGATCAGAAG**CAGATAAACAACCTGGTTCATAAACCAAG

→
IQSTML

GAAGCGACACTGGAAGCCATCCGAGGATATGCAGTTTGTGGTAATGGATGCTGCTCACTCTCACTATTATA

←
IQSTMR

TTGACAATATCTTTGGGAACCCCTTACCCCATGGATGTGTGCGTCTCTTAGATGCATATRATGTTGGATATC
ATAACAACCTACCATGAAGGAATGARAGTGTATATGATCTCATCTGAACGGCCGCAAAAGAAAGGATTTTGC
ATGTTAGTGTATGCATGTTGCTGTTACCTATTATGCTGTTTTTTRATGATTCTACGTTTATGTAATGTCAC
TCGGAATCAGTAGTAAGTTATACATAATGTGATGTTTATTATATGCGAAAAAAA

Figure 69 : Localisation des amorces de PCR en Temps Réel sur la séquence *CiSTM*

TGACATCGACTGGATATGAGTAGAAAACAATTTTTCCGGTGGAAATTCGCGCGGAGATTTCTCAYTGTTCGTC
GCTCACTTACTTGGACCTCAGCCGAAACCAACTCACAGGTCCAATGCCTCCTCAAATATCACAACCTCCACA
TACTGAATTATCTCAATGTCTCATGGAACCACCTTAACGAAACCCCTACCTGACGAATTCGGTTCCATGAAA
AGCCTTACATCCGCAGATTTCTCCACAACAACCTTATCCGGTTCAATCCCTGAGACCGCCAGTACACCCT
CATGAAGCCCATCTCCTTTTTCCGGCAACCCTAACCTCTGTGCACCTTTCTGAACCACACCTGCAACAACCT
CGTCTTCCACATTGCTTCCACAACCAACAATCAAGTTGATAACAAACCCACAAAGGTTCCCGGAAAAATAC
AAGCTTATTTTCGCTTTGGGACTTTTAGTTTGTTCGCTCGCATTTCGTCATATTAGCAGTTATCAAGACTAG
AAAGATGAGAACCACCAATTCTAAATCAA**CCTGGAAGCTCACCGCATVTC**AAAAACTAGAGTTTGGGAGCC

→
IQCLVIL

AAGATATTCTCGAATGCTTGAAGACAATAACATTATCGGGCAAGGTGGTGCAGGTGTTGTTTATGGCGGA
ACAATG**CCAAACGGAGAGCAAGTAGCA**ATCAAGAAGCTGGGAACAAGCAAAGGCAATGGCAGTTCACACGA

←
IQCLVIR

CTGTGGCCTGTCTGCAGAGATACAGACACTGGGAAGGATACGACATCGTTATATAGTGAGGTTAATGGCAC
TTTGTTCGAACAAGGAGACAAATTTACTGATCTATGAGTACATGCCTAATGGTAGCTTAGGTGAACCTCCTT
CACGGCAAGAAAGGTGGTTGCGTGCTTAAGTGGGATACGAGGCTAAAAATAGCTATAGAAGCCGCAAGGG
TCTTTGTTACTTGCATCATGATTGTTACCTCTTATTATTTCATCGGGACGTTAAGTCCAACAACATCTTAC
TTAGTTCAGATTTTGGAGCACATGTAGCAGATTTCCGGCTTGCAAAATTCCTGTCATGAAGGTGGTGCATCG
GAGTGTATGTCTGCTATCGCGGGGTCGTATGGTTATATTGCTCCAGAATATGCCTACACATTGAAGATTGA
TGAAAAAAGTGCAGTGTATAGTTATGGGGTGGTACTCTTGAGCTAATCACGGGGCGAAGACCAGTTGGGG
ACTTTGGGGAAAAATGGATTGGACATTGTTTCGATGGACGAAAATGCAAACGAACGGGTGCAAGAAGGAGTT
GAGAAGATATTGGATGAACGACTGAAGAAGGTTCCACTAGATGAAGTAAAGCAGATGATGTTTCGTGGCAAT
GTTGTGTGTACAAGAACAACGTTGGAGAGACCGACCATGAGAGAGGTGGTGCAGATGCTTGTACAAGCTA
AGCAGCCCAATACATTCCAAACGCATTAATTTTATTACTTGGTTGTAACAAAAATAAAAGATTTGAGGTGG
TAATTAGACGTTTTCGCGTTGACGGTTGATGGAAAATAAATTACTGGTGGACGGATTTTACTGAAATGTTA
ACATAATCGAGTTGCTTGGCTACAAGGTCGATGAATCCTATCCTCATGTAGTTTATTTTTGTTGAAAGTTGT
TG

Figure 70 : Localisation des amorces de PCR en Temps Réel sur la séquence *CiCLV1p*

Résultats : Etude du profil d'expression des transcrits *CiCLV1* et *CiSTM*

La première étape consiste à calculer le ΔCt . Dans notre cas, il correspond à la différence entre le Ct de la cible et le Ct du contrôle pour un jour de culture (J_n):

$$\Delta Ct_{J_n} = Ct_{J_n} \text{ cible} - Ct_{J_n} \text{ contrôle}$$

La seconde étape consiste à calculer le $\Delta\Delta Ct$. Pour calculer le $\Delta\Delta Ct$, il est nécessaire de définir un ΔCt référence ($\Delta Ct_{J_{ref}}$) pour chaque cible qui sera soustrait au ΔCt des différents jours. L'état de référence a été déterminé selon le processus étudié (cf paragraphes 3.2 et 3.3).

$$\Delta\Delta Ct_{J_n} = \Delta Ct_{J_n} - \Delta Ct_{J_{ref}}$$

La troisième étape consiste à calculer la quantité relative (QR) de transcrits de la cible aux différents jours de cinétique par rapport à la quantité de cible au jour de référence.

$$QR = 2^{(-\Delta\Delta Ct_{J_n})}$$

Pour exprimer nos résultats, deux gènes contrôles ont été utilisés pour normaliser les quantités de transcrits des gènes cibles *CiSTM* et *CiCLV1p*. Il s'agit du gène *18S* dont l'ARN associé à des protéines forme la petite sous-unité du ribosome. Les amorces ont été définies à partir d'un alignement de séquences d'ADN *18S* de différentes Astéracées (Annexe 26).

La deuxième référence est un gène de *β actine*. Les amorces ont été définies à partir d'une séquence partielle d'un ADNc cloné chez la chicorée (Poulain, 2003) (Annexe 27).

Les amorces ont été déduites pour les cibles et les contrôles grâce au logiciel Beacon Designer[®] (Biosoft). Les localisations des amorces sur les séquences de *CiCLV1p* et *CiSTM* sont proposées sur les figures (Figures 69 et 70). L'amorce IQSTML est définie dans l'homéodomaine et l'amorce IQSTMR est définie en amont de l'homéodomaine sur la séquence *CiSTM*. Les amorces IQCLVL et IQCLVR sont toutes les deux définies dans la région intracellulaire de la séquence *CiCLV1p*.

Pour l'embryogenèse zygotique, nous disposons d'une cinétique d'akènes prélevés à différents jours après la pollinisation (jap) de J0 à J19. Pour l'embryogenèse somatique, nous disposons de deux cinétiques de fragments foliaires aux différents jours de culture, une pour le génotype K59 et une pour le génotype C15, de J0 à J8. Après extraction des ARN, trois RT ont été réalisées pour chaque jour de la cinétique et chacun des génotypes. Pour chaque RT, un Ct moyen a été calculé à partir de trois amplifications simultanées. Après les différentes amplifications, pour chaque cinétique de RT, les ΔCt ont été calculés aux différents jours par

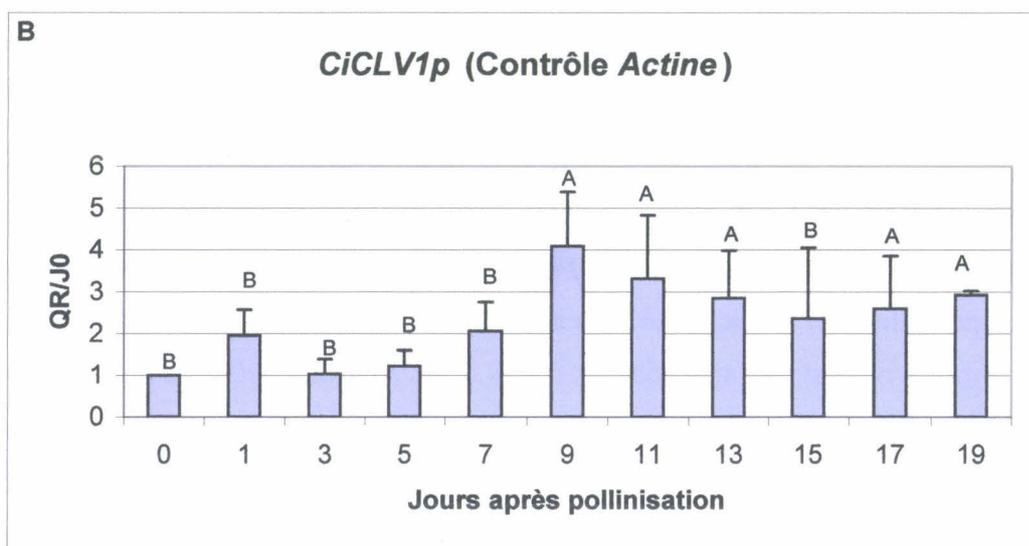
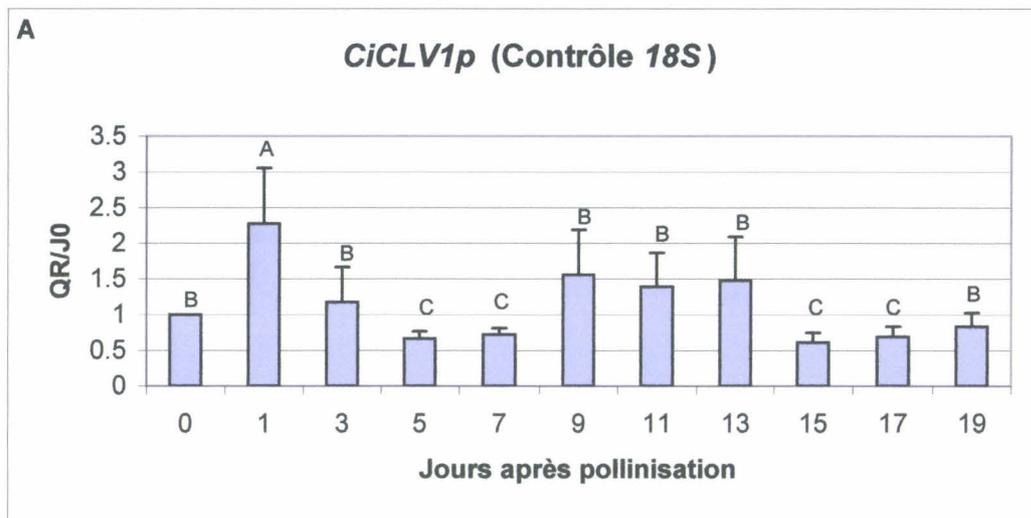


Figure 71 : Evolution de la quantité relative des transcrits *CiCLV1p* au cours de l'embryogenèse zygotique de la chicorée .

A: contrôle 18S

B: contrôle *Actine*

Les différences significatives de QR ont été calculées par rapport au J0 (jour de référence) avec le test de Student-Newman-Keuls. Chaque jour ayant une lettre différente de celle du J0 est significativement différent de ce dernier au seuil de 5%. Les barres d'erreur représentent les écarts types.

Résultats : Etude du profil d'expression des transcrits CiCLV1 et CiSTM

rapport aux Ct moyen des gènes contrôle aux jours correspondants. Les $\Delta\Delta Ct$ pour chaque cible ont été calculés aux différents jours par rapport au jour référence. Les QR (Quantités Relatives) ont ensuite été déduites des $\Delta\Delta Ct$. Les trois valeurs de QR pour chaque jour ont été moyennées. A partir des résultats obtenus, un test statistique de comparaison multiple de moyenne a été réalisé (test de Student-Newman-Keuls), ce qui a permis d'établir des classes de valeurs.

Pour interpréter les résultats, nous avons considéré les différences statistiques observées, mais aussi une variation de QR au moins égale à deux fois à celle du jour de référence, pour conclure à une réelle variation de l'accumulation des transcrits.

3.2. Etude de l'expression des transcrits CiCLV1p et CiSTM au cours de l'embryogenèse zygotique chez la chicorée

Accumulation des transcrits CiCLV1 (Figure 71 A et B).

Avec le contrôle *18S*, sauf à 1 jap, il n'y a pas de variation de plus d'un facteur deux de la QR de transcrits *CiCLV1p* par rapport à celle du jour de référence (J0ap), même si les résultats obtenus sont statistiquement différents du J0ap pour certains jours de la cinétique.

Avec le contrôle *Actine* (Figure 71 B), une analyse statistique a été réalisée avec le J0 comme référence. Jusqu'à 9 jap, la QR de transcrits n'est pas différente de celle du J0. Une augmentation de 4 fois de la QR est observée 9 jap. On observe ensuite un maintien d'un facteur 2 à 3 par rapport au jour de référence jusqu'à la fin de la cinétique.

Avec la référence *Actine*, les résultats des analyses semblent plus simples à interpréter. En effet, si on considère que l'expression du gène contrôle *Actine* est stable au cours de la cinétique, on observe une augmentation de la QR de transcrits *18S* exprimés par rapport au contrôle *Actine* (Annexe 28). Les QR de transcrits *18S* sont stables jusqu'à 5 jap, puis elles augmentent de façon significative dès 7 jap et sont stables jusqu'à 19 jap. Ce résultat n'est pas très surprenant dans la mesure où le processus d'embryogenèse zygotique nécessite une synthèse abondante de protéines. Cette augmentation du niveau des transcrits *18S* explique pourquoi on ne détecte pas à partir de 9 jap d'augmentation de l'expression du gène *CiCLV1p* avec le contrôle *18S*.

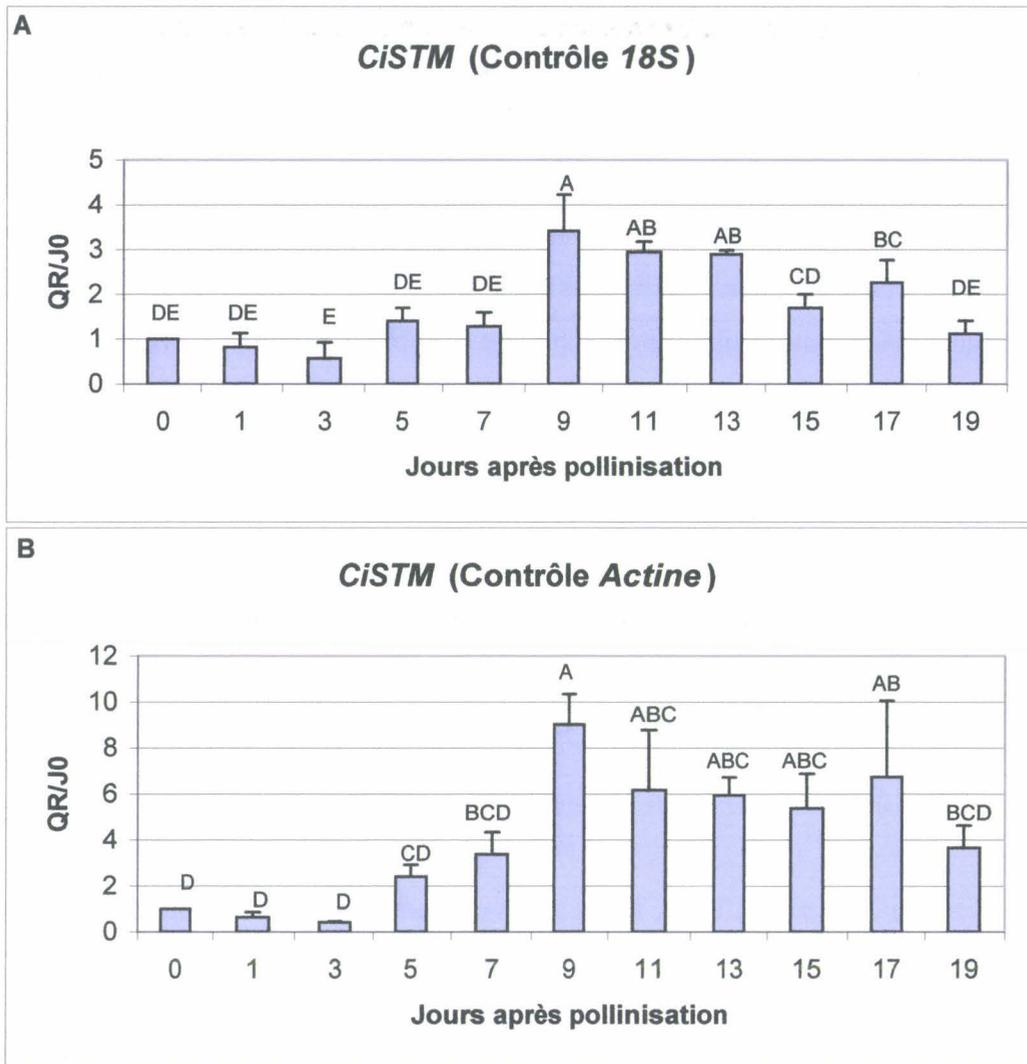


Figure 72 : Evolution de la quantité relative des transcrits *CiSTM* au cours de l'embryogenèse zygotique de la chicorée.

A: contrôle *18S*

B: contrôle *Actine*

Les différences significatives de QR entre les jours ont été calculées avec le test de Student Newman-Keuls. Chaque jour ayant une lettre différente de celle d'un autre jour est significativement différent de ce dernier, au seuil de 5%. Les barres d'erreur représentent les écarts types.

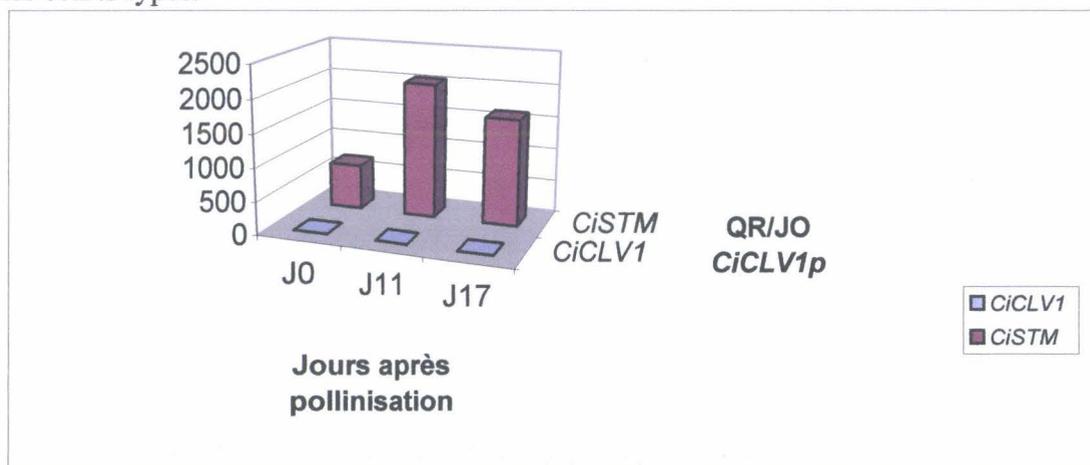


Figure 73 : Variation de la quantité relative des transcrits *CiCLV1p* et *CiSTM* exprimée en fonction du J0 *CiCLV1p* (QR = 1) au cours de l'embryogenèse zygotique de la chicorée (Contrôle *18S*).

Résultats : Etude du profil d'expression des transcrits CiCLV1 et CiSTM

Accumulation des transcrits CiSTM (Figure 72 A et B).

Avec le contrôle *18S* (Figure 72 A), les transcrits *CiSTM* sont détectés avant la pollinisation. La QR par rapport à J0ap reste globalement constante jusqu'à 7 jap. On observe une augmentation significative de la QR à 9 jap (3 fois plus que le J0ap) et ce niveau se maintient jusque 13 jap. Sur la période 15 jap-17 jap, la QR de transcrits *CiCLV1p* diminue mais reste supérieure à celle mesurée à J0ap. A 19 jap, le niveau est identique à celui du J0ap.

Avec le contrôle *Actine* (Figure 72 B), les résultats sont globalement identiques et hautement significatifs sur l'ensemble de la cinétique. On observe une augmentation significative de la QR de transcrits à 9 jap (8 fois plus que la QR à J0). Ce niveau reste constant jusque 17 jap puis diminue légèrement à 19 jap mais reste supérieur au J0ap.

La différence notable entre les deux contrôles réside dans l'amplitude des variations de transcrits observées à partir de 9 jap. Avec le contrôle *18S*, la QR de transcrits sur la période 9-17 jap est deux à trois fois supérieure à celle observée à J0ap ; avec le contrôle *actine*, les valeurs de QR sont cinq à huit fois supérieures sur la même période. A nouveau, on peut expliquer cette différence si on considère que le niveau de transcrits du gène *18S* augmente au cours du processus d'embryogenèse zygotique.

Comparaison des niveaux de transcrits CiSTM et CiCLV1p au cours de l'embryogenèse zygotique (Figure 73).

Une analyse de la comparaison du niveau de transcrits *CiSTM* et *CiCLV1p* a été réalisée au cours de l'embryogenèse zygotique avec comme contrôle le gène *18S*. Les résultats sont exprimés en prenant comme référence la QR de transcrits *CiCLV1p* à J0ap (QR = 1). Le niveau d'accumulation des transcrits *CiSTM* est toujours supérieur à celui des transcrits *CiCLV1p*. Avant la pollinisation (J0ap), il y a 700 fois plus de transcrits *CiSTM* que de transcrits *CiCLV1p* et au J11, il y en a 2000 fois plus.

3.3. Etude de l'expression des transcrits CiCLV1p et CiSTM au cours de l'embryogenèse somatique chez les géotypes K59 et C15

Accumulation des transcrits CiCLV1p dans les feuilles des géotypes C15 et K59 (Figure 74).

Quel que soit le contrôle pour le géotype C15 (Figure 74, A et B), le premier point à observer est que la QR de transcrits a été considérée comme non différente du bruit de fond

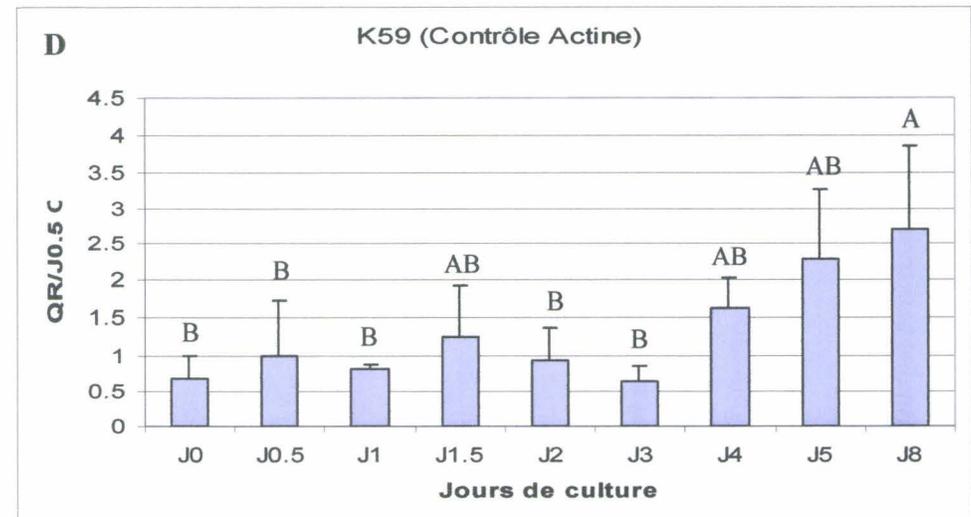
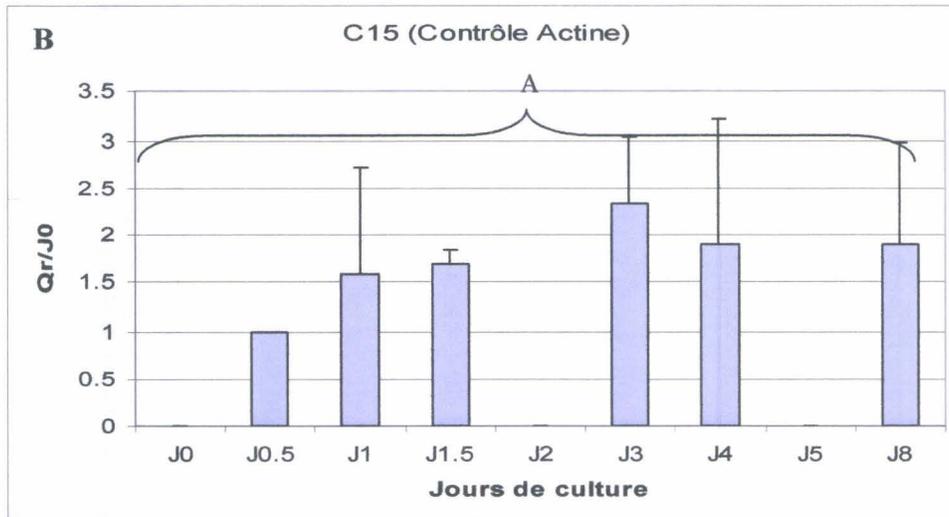
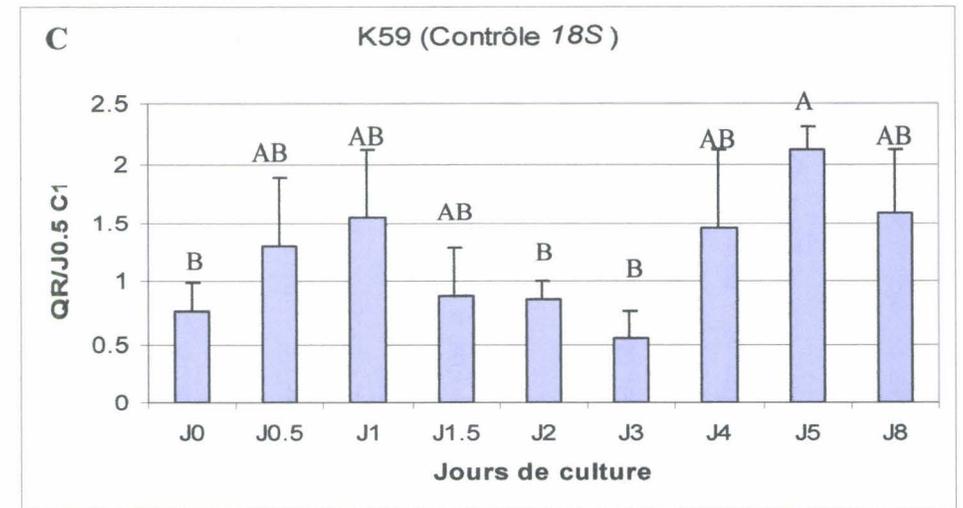
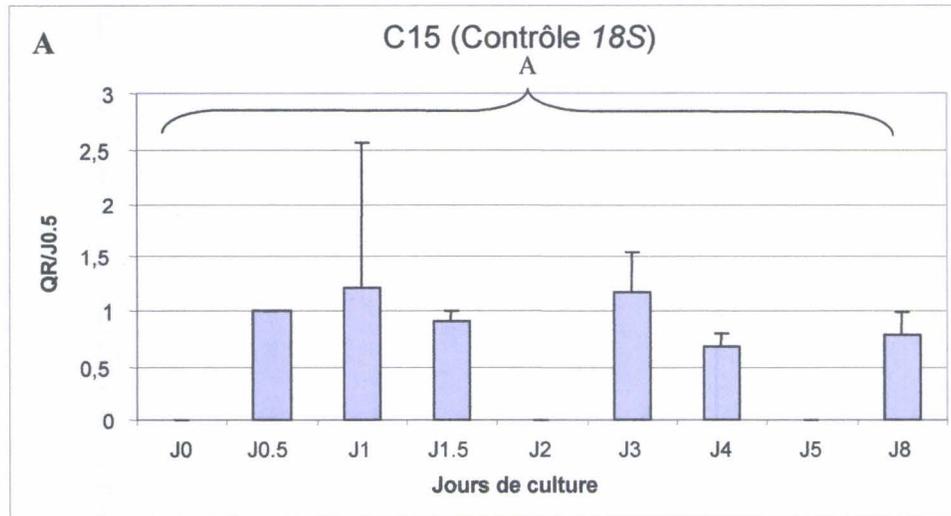


Figure 74 : Evolution de la quantité relative des transcrits *CiCLV1p* chez les géotypes C15 et K59 en fonction des jours de culture en condition embryogène. Les différences significatives de QR entre les jours ont été calculées avec le test de Student-Newman-Keuls. Chaque jour ayant une lettre différente de celle d'un autre jour est significativement différent de ce dernier, au seuil de 5%. Les barres d'erreur représentent les écarts types.

Résultats : Etude du profil d'expression des transcrits CiCLV1 et CiSTM

pour trois jours de la cinétique: J0, J2 et J5. Le J0.5 de la cinétique a alors été choisi comme jour de référence. Le test de comparaison multiple de moyenne montre qu'au cours de la cinétique la QR de transcrits ne varie pas quel que soit le contrôle. Les transcrits *CiCLV1p* ne sont donc pas exprimés de façon différentielle au cours de la culture de fragments foliaires du génotype C15.

Afin de permettre les comparaisons des niveaux de transcrits entre les deux génotypes, les résultats concernant le génotype K59 (Figure 74, C et D) ont été exprimés par rapport au jour de référence du génotype C15 (J0.5 C15) pour les différentes cibles. Dans ce cas les $\Delta\Delta Ct$ ont été calculés en soustrayant aux différents ΔCt de la cible pour chacun des jours le ΔCt du J0.5 C15 de la même cible.

Au cours de la culture de feuilles du génotype K59, les transcrits *CiCLV1p* présentent une cinétique d'accumulation différente de celle observée chez le génotype C15.

Avec le contrôle *18S* (Figure 74 C), les transcrits sont détectés et quantifiés tout au long de la culture mais le seul point significatif est observé à J5 où la QR de transcrits *CiCLV1p* est multipliée par un facteur supérieur à deux par rapport au J0.

Les résultats obtenus avec le contrôle *Actine* (figure 74 D) présentent des similitudes puisque l'accumulation des transcrits est au moins doublée à partir de J5 et est trois fois supérieure à celle du J0 à J8.

Il est alors possible de conclure à une induction de l'expression du gène *CiCLV1p* à partir de J5, quel que soit le contrôle.

De la même façon que pour la cinétique d'embryogenèse zygotique, nous avons représenté l'évolution du niveau de transcrits du gène *18S* en considérant l'expression du gène d'actine stable au cours des cinétiques d'embryogenèse somatique (Annexe 29). Au cours des cinétiques d'embryogenèse somatique des génotypes K59 et C15, nous n'avons pas observé de différence significative des QR des transcrits *18S* exprimés avec le contrôle *Actine*. Quand des fluctuations existent selon le gène contrôle utilisé, elles peuvent expliquer les différences de profils d'accumulation des transcrits *CiCLV1p*.

Accumulation des transcrits *CiSTM* dans les feuilles des génotypes C15 et K59 (Figure 75).

De même pour les transcrits *CiCLV1p* chez le génotype C15, la QR des transcrits *CiSTM* (Figure 75, A et B) a été considérée comme non différente du bruit de fond au J0, J2 et J5. Les résultats d'expression ont donc été exprimés par rapport à la quantité de transcrits au J0.5 du génotype C15 qui sera de 1 et ceci pour les deux gènes contrôles.

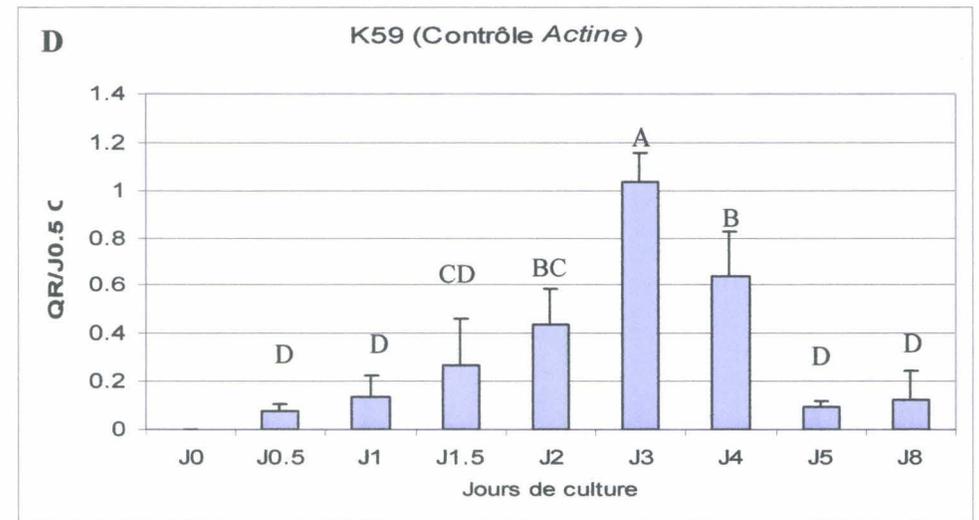
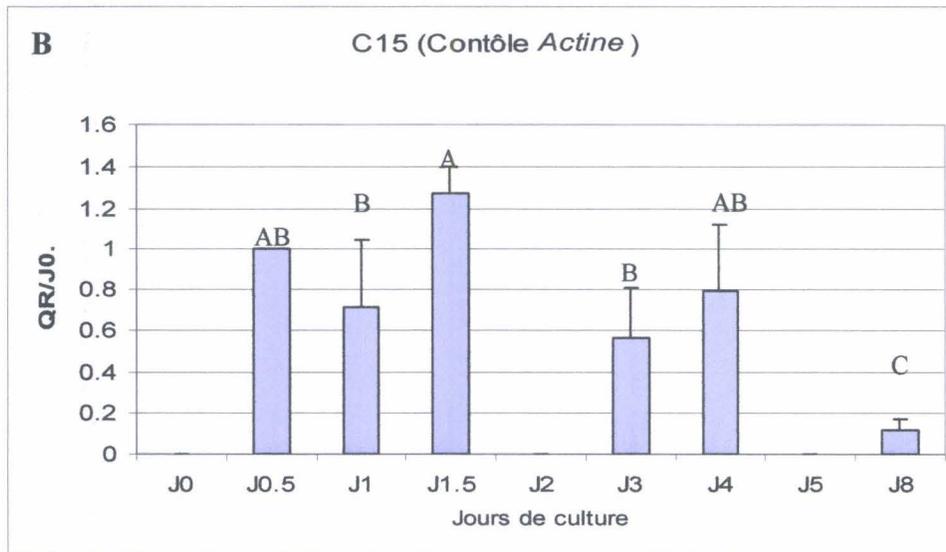
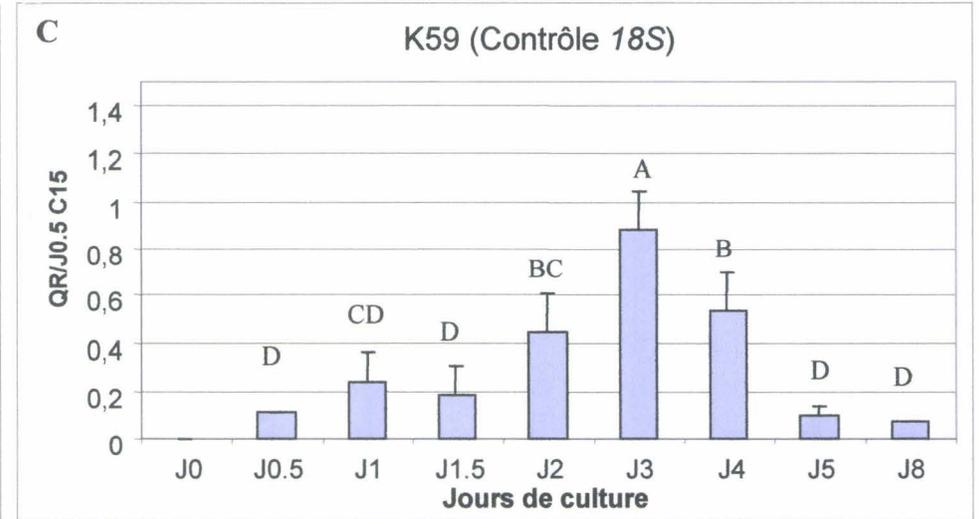
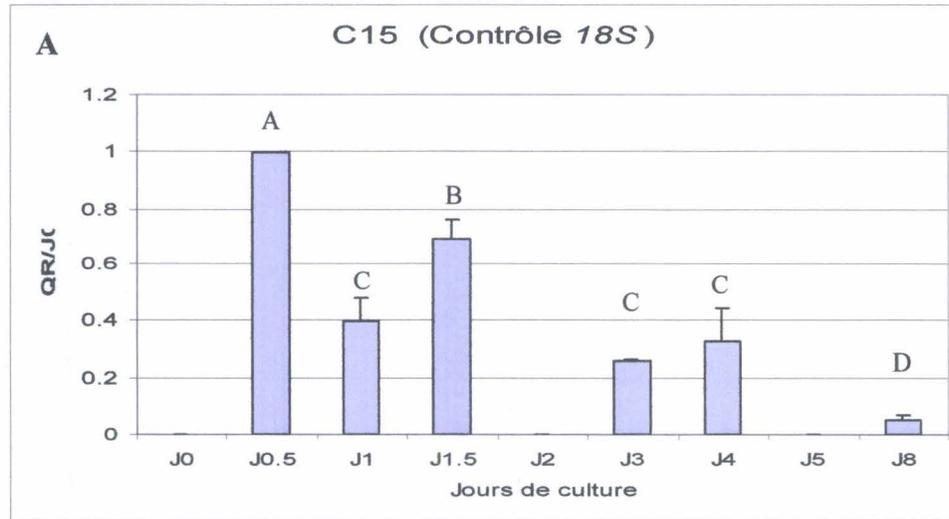


Figure 75 : Evolution de la quantité relative des transcrits *CiSTM* chez les génotypes C15 et K59 en fonction des jours de culture en condition embryogène. Les différences significatives de QR entre les jours ont été déterminées avec le test de Student-Newman-Keuls. Chaque jour ayant une lettre différente de celle d'un autre jour est significativement différent de ce dernier au seuil de 5%. Les barres d'erreur représentent les écarts types.

Résultats : Etude du profil d'expression des transcrits CiCLV1 et CiSTM

Pour le génotype C15, une diminution nette de l'accumulation des transcrits est observée dès J1 avec le contrôle *18S*. Avec le contrôle *Actine*, cette diminution est moins évidente. Cependant, quel que soit le gène contrôle, la QR des transcrits est cinq fois moins importante à J8 qu'à J0.5.

Les résultats obtenus pour le génotype K59 (Figure 75, C et D) ont été exprimés par rapport au J0.5 C15. Au J0, la QR de transcrits *CiSTM* n'est pas considérée comme différente du bruit de fond. Au cours de la culture de fragments foliaires du génotype K59, les profils d'expression des transcrits *CiSTM* sont nettement différents de ceux obtenus chez le génotype C15, quel que soit le gène contrôle. En effet, une induction de l'expression des transcrits est visible dès le J2 de culture. A J3, la QR est presque 8 fois supérieure à celle du J0.5 pour le contrôle *18S* et 13 fois supérieure à la QR du J0.5, dans le cas du contrôle *Actine*. Après le J3 et pour les deux contrôles, la QR diminue de façon significative jusqu'à atteindre la QR du J0.5 à J5 et J8. Ces résultats s'expliquent du fait de la relative stabilité de l'expression des contrôles au cours de la cinétique d'embryogenèse somatique mais aussi parce que l'intensité du pic d'accumulation du gène *CiSTM* observé à J3 est élevée.

Une comparaison des QR de transcrits *CiSTM* aux J0.5 pour les génotypes C15 et K59 révèle une variation importante de la QR. En effet, il y a 13 fois plus de transcrits chez C15 que chez K59 au J0.5, ceci étant observé pour les deux références.

Comparaison des niveaux de transcrits *CiSTM* et *CiCLV1p* chez le génotype K59 (Figure 76).

Une analyse de la comparaison du niveau de transcrits *CiSTM* et *CiCLV1p* a été réalisée chez le génotype K59 avec comme gène contrôle l'ADN *18S*. Les résultats sont exprimés relativement au J1 *CiCLV1p* (QR = 1). Comme au cours de l'embryogenèse zygotique de la chicorée, le niveau d'expression des transcrits *CiSTM* est toujours supérieur à celui des transcrits *CiCLV1p*. Au J1 de la culture embryogène, il y a 460 fois plus de transcrits *CiSTM* que de transcrits *CiCLV1p* et au J3, il y en a 1700 fois plus. Même au J8, qui correspond à la QR de transcrits *CiCLV1p* la plus élevée, les transcrits *CiSTM* sont 180 fois plus représentés.

Comparaison de la QR des transcrits *CiSTM* et *CiCLV1p* entre les processus d'embryogenèse somatique et zygotique (Figure 77 A et B).

Des analyses ont été réalisées dans le but de comparer les QR de transcrits de chacun des gènes cibles accumulés au cours des embryogenèses somatique et zygotique de la chicorée. Pour cela, les QR des transcrits *CiCLV1p* exprimés dans des fragments foliaires du

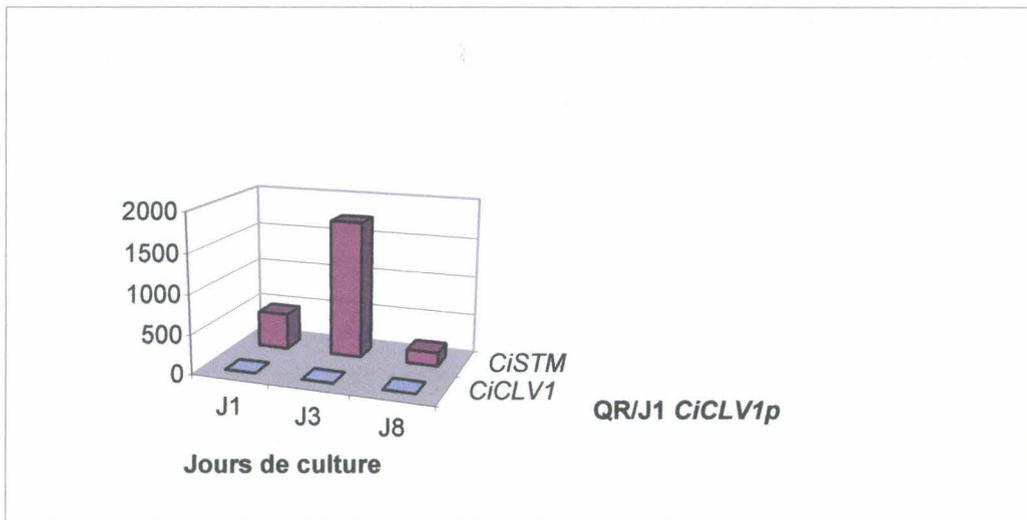


Figure 76: Variation de la quantité relative des transcrits *CiCLV1p* et *CiSTM* exprimée en fonction du J1 *CiCLV1p* (QR = 1) chez le génotype K59 cultivé en condition d'induction de l'embryogenèse somatique (Contrôle *18S*).

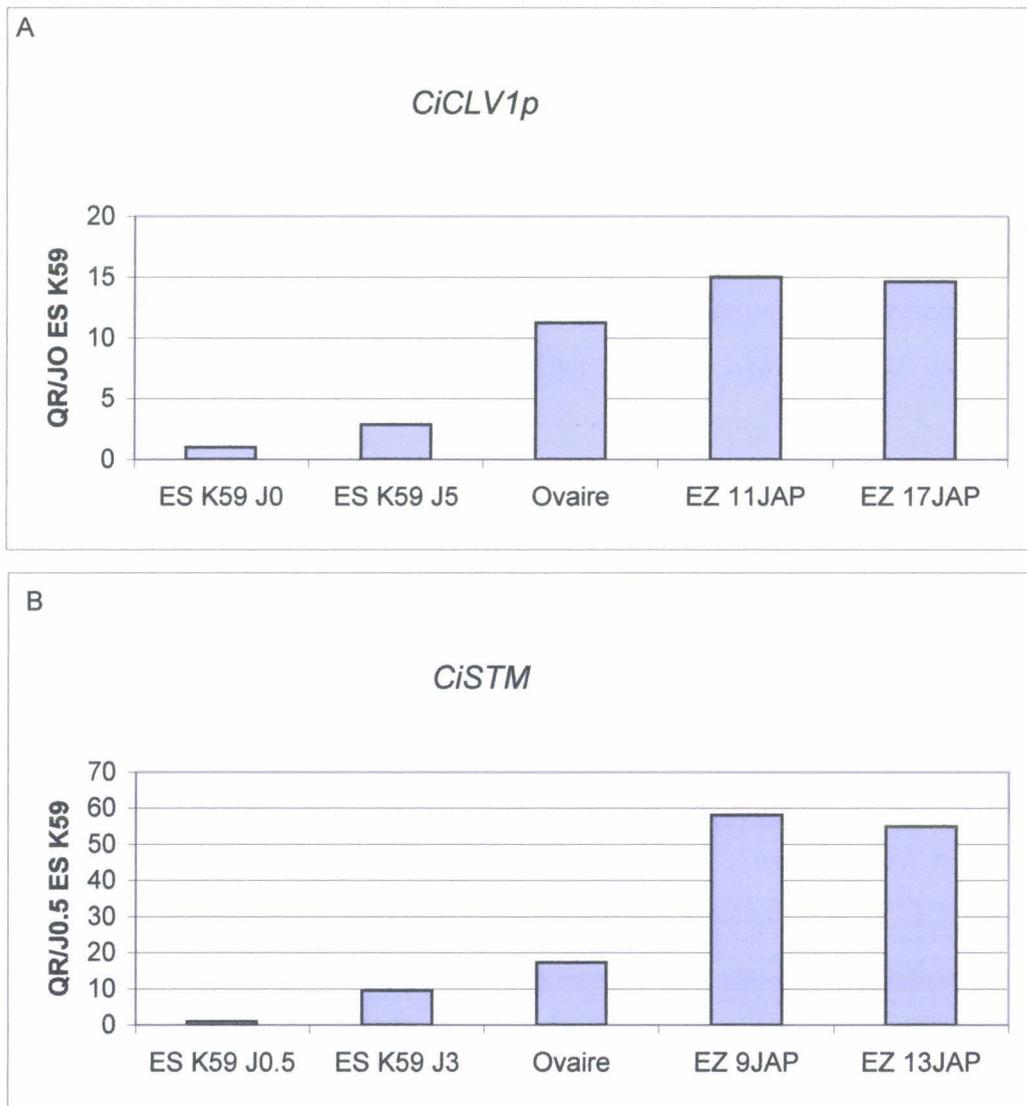


Figure 77: Comparaison de la quantité relative des transcrits *CiCLV1p* (A) et *CiSTM* (B) au cours de l'embryogenèse somatique et zygotique. Les résultats sont exprimés relativement au J0 ES K59 (*CiCLV1p*) ou au J0.5 ES K59 (*CiSTM*). Le gène de contrôle utilisé est le *18S*.

Résultats : Etude du profil d'expression des transcrits *CiCLV1* et *CiSTM*

génotype K59 cultivés 5 jours en condition embryogène, dans des ovaires (J0ap), dans des embryons zygotiques 11 jap et 17 jap ont été comparées à la QR de fragments foliaires du génotype K59 non induits (J0; QR = 1) (Figure 77 A).

Au cours des cinétiques d'embryogenèse somatique et zygotique, les variations intra-cinétiques d'accumulation de transcrits *CiCLV1p* ne sont jamais supérieures à deux fois. Par contre, les variations entre les deux processus sont importantes, on trouve en moyenne six fois plus de transcrits au cours de l'embryogenèse zygotique. D'autre part, la quantité de transcrits *CiCLV1p* observée dans les ovaires à J0ap est dix fois supérieure à celle observée dans les feuilles avant la mise en culture.

De même pour *CiSTM*, des analyses ont été réalisées afin de comparer les QR des transcrits *CiSTM* de fragments foliaires cultivés trois jours en condition embryogène, d'ovaire (J0ap), et d'embryons zygotiques de 9 jap et 13 jap (Figure 77 B). Ces différents points ont été choisis car ils correspondent à des valeurs minimales, maximales et intermédiaires de QR. Ces valeurs ont été comparées à un état de référence constitué par des fragments foliaires du génotype K59 cultivés une demi journée en condition embryogène (QR = 1).

Au cours de l'embryogenèse somatique de chicorée, on observe des variations importantes d'accumulation de transcrits. Par exemple, entre le J0.5 et J3, il y a 10 fois plus de transcrits *CiSTM* au J3 de la culture embryogène.

Au cours de l'embryogenèse zygotique, les variations sont de trois fois entre le J0ap (ovaire) et 9 jap et 13 jap.

Entre ces deux processus, les quantités de transcrits *CiSTM* sont très différentes: il y a 20 fois plus de transcrits dans l'ovaire qu'au J0.5 de la culture embryogène et 50 fois plus à 9 jap et 13 jap qu'au J0.5 de la culture embryogène. Il n'y a plus que cinq fois plus de transcrits à 9 jap et 13 jap par rapport au J0.5 de la culture embryogène.

En conclusion, nous avons observé plus de transcrits des gènes *CiCLV1p* et *CiSTM* accumulés au cours de l'embryogenèse zygotique de la chicorée, en comparaison des tissus foliaires soumis à l'induction de l'embryogenèse somatique.

Discussion

Le travail présenté ici peut se découper en trois parties. La première concerne la caractérisation cytologique des stades de l'embryogenèse zygotique chez la chicorée. En effet, nous avons pour la première fois au laboratoire réalisé ce type d'étude. Les différents stades sont caractéristiques de ceux classiquement observés au cours de l'embryogenèse zygotique chez différentes espèces, avec cependant quelques différences.

A 18 hap, chez la chicorée, l'albumen n'est pas cellularisé, le noyau $3n$ est toujours présent. L'ensemble du gamétophyte mesure à ce stade entre 200 et 300 μm et reste dans l'axe du micropyle. Chez *Arabidopsis thaliana*, la seconde division du noyau $3n$ est visible entre 12 et 24 hap (Faure *et al.*, 2002). Les premières divisions de l'albumen semblent plus rapides chez *Arabidopsis thaliana*.

Entre 24 et 34 hap, l'albumen est cellularisé dans les embryons de chicorée. Chez *Arabidopsis*, à 24 hap, la majorité des graines possèdent un albumen à huit noyaux qui devient rapidement cellularisé. La cellularisation de l'albumen chez la chicorée et *Arabidopsis thaliana* semble suivre la même cinétique d'évolution (Faure *et al.*, 2002).

Dès le stade octant à 34 h, il est possible d'observer des caractéristiques communes à d'autres espèces. En effet, la première cellule du suspenseur est très vacuolisée et le noyau est polarisé vers la tête embryonnaire. Cette caractéristique a déjà été observée chez la capselle. Ce schéma d'organisation tend à prouver que la première division du zygote est comme chez beaucoup d'Angiospermes asymétrique. Dans ce cas, la petite cellule génère l'embryon et la grande cellule donne naissance à l'hypophyse et au suspenseur. De plus, un axe radial est aussi mis en place. Il est défini comme un arrangement concentrique de tissus du centre vers la périphérie de l'embryon. Chez *Arabidopsis*, cet axe est visible dès le stade octant avec la mise en place du protoderme (Laux *et al.*, 1997). Chez la chicorée, cet axe est visible au stade dermatogène avec la mise en place du tissu dermatogène.

Chez *Arabidopsis*, au stade torpille, le MAC présomptif, localisé dans la moitié supérieure de l'embryon, est composé de trois couches qui sont les précurseurs des couches L1, L2 et L3 (Barton et Poethig, 1993). Dans l'embryon de chicorée, des différences cytologiques sont visibles au stade torpille. En effet, des cellules cytologiquement denses et plus rondes apparaissent entre les cotylédons. Les modifications cytologiques sont nettement visibles au stade que nous avons appelé cotylédonaire 1. En effet, un dôme émerge entre les

Discussion

cotylédons. Les cellules de ce dôme sont cytologiquement différentes : isodiamétriques et à cytoplasme dense.

L'étude réalisée par Baud *et al.* en 2002 a permis de préciser la cinétique d'accumulation des réserves chez *Arabidopsis*. Concernant les hydrates de carbone, l'accumulation la plus visible concerne l'amidon qui est mis en réserve au début de la phase de maturation quand l'embryon est au stade cœur / torpille. Les hexoses et le saccharose s'accumulent plus tardivement. Les acides gras et les lipides s'accumulent après le stade torpille. Les acides aminés libres s'accumulent en plusieurs pics à partir du stade globulaire puis dans l'embryon développé, et juste avant la phase de déshydratation. Dans l'embryon de chicorée, au stade cotylédonnaire tardif, des amas sont visualisés dans les cellules qui ont un aspect gonflé. On peut mettre ces structures en relation avec une accumulation d'amidon ou d'un autre composé de réserve. Cependant, avec les connaissances chez *Arabidopsis*, il n'est pas possible d'identifier ces réserves. Une étude biochimique est nécessaire pour identifier ces réserves et estimer leur cinétique d'accumulation.

La deuxième partie de ce travail concerne la caractérisation cytologique des nouveaux génotypes embryogène (K59) et non embryogène (C15). L'objectif fixé au départ a été atteint puisque le nouveau matériel d'étude de l'embryogenèse somatique du laboratoire a été caractérisé cytologiquement. Des études préliminaires réalisées sur les nouveaux génotypes avaient montré que ces explants ne réagissaient pas de la même manière que l'ancien modèle du laboratoire (hybride "474"). De nouvelles figures de réactivation ont été observées au sein des tissus embryogènes du génotype K59.

De manière à classer ces figures, nous avons donc réalisé un référentiel des figures de réactivation observées chez les nouveaux génotypes. Cependant dans le cas des embryons somatiques que nous avons observé au sein des tissus, un problème d'interprétation des figures s'est posé puisque ces embryons potentiels que nous avons appelées zones denses ne ressemblaient pas aux embryons somatiques classiquement observés chez l'hybride "474" (Robatche-Claive *et al.*, 1992). Les résultats de Haensch en 2004 ont soulevé de la même manière des difficultés dans l'interprétation des figures cytologiques évoluant soit en embryon soit en bourgeon chez le Pélargonium.

Dans notre cas, chez le génotype K59, il existe différentes voies morphogènes, la première est celle des zones denses qui donneront soit des embryons somatiques, qui ne possèdent pas de connections vasculaires, soit des bourgeons. Les ZV observées produiront des nodules dans 20% des cas ou des zones de prolifération dans 80% des cas (Blervacq,

Discussion

communication personnelle). Cependant, il a pu être observé de l'embryogenèse somatique secondaire sur des nodules ou des zones de proliférations issues des zones denses chez le génotype K59 à des stades tardifs de culture (Blervacq, communication personnelle).

Les résultats concernant la relative synchronisation de la première division observée chez le génotype "474" sont ici confirmés pour le génotype K59 puisque la vitesse d'évolution des cellules est ralentie en présence de glycérol. De plus, en présence de glycérol, l'augmentation du nombre de CER jusqu'au 4^{ème} jour reflèterait l'effet osmotique du glycérol qui provoque une légère plasmolyse, le noyau de la cellule serait donc stimulé et provoquerait le passage vers l'état CR.

Au quatrième jour, les fragments sont transférés dans un milieu dépourvu de glycérol, le nombre de CER reste constant jusqu'au onzième jour. La différence observée pour l'apparition des ZD/ZV peut s'expliquer par le fait que ces figures sont issues de voies différentes. En ajoutant du réactif de Yariv, un anticorps artificiel spécifique des Arabino-Galactan-Proteins au milieu de culture, la voie d'obtention des ZD est diminuée et celle des ZV n'est pas affectée par le réactif de Yariv (Habarugira, 2004).

A l'aide du référentiel établi, des comptages ont été réalisés à partir de cinétiques de mise en culture d'explants de feuilles et de racines en condition embryogène. Ces données nous ont permis de réaliser une sélection de génotypes embryogène (K59) et non embryogène (C15) ayant le même fond génétique. Les feuilles du génotype K59 cultivées en condition embryogène ont permis au premier et second jour de culture d'obtenir plus de CER que sur les racines. Ces résultats peuvent être corrélés à la présence des nervures dans les feuilles. Cette proximité des cellules avec les vaisseaux conducteurs leur permettrait de les utiliser comme des sources et de réagir plus rapidement à l'induction. Des résultats contraires ont été observés pour les CR qui sont plus abondantes dans les racines que dans les feuilles du génotype K59. Ceci tend à montrer qu'il existe une régulation différente du cycle cellulaire entre les organes.

L'implication de gènes régulateurs du cycle cellulaire a été étudiée chez des fragments foliaires des génotypes K59 et C15 cultivés en condition embryogène (Fournier, 2004). Des premiers résultats de PCR en temps réel montrent l'implication de la cycline B1 de chicorée (*Ci;CYB1;1*) au cours de la culture embryogène de feuilles du génotype K59. En effet, l'accumulation des transcrits augmente significativement à J2 et J3 de la culture. Des analyses identiques réalisées chez le génotype C15 montrent que la QR des transcrits

Discussion

Ci;CYB1;1 reste constante au cours de la culture. Ces résultats suggèrent une réelle implication de régulateurs du cycle cellulaire.

Le génotype non embryogène choisi comme référence est le génotype C15. Au cours de la culture de fragments foliaires, seules des CER ont été obtenues. Au cours de la culture de fragments racinaires, des CER et quelques rares ZV ont été observées. Ces résultats ne sont pas surprenants puisque ce génotype est capable de développer des bourgeons en conditions de culture organogène. Ce génotype est donc capable de répondre à un signal dans ces conditions de culture. Dans nos conditions d'embryogenèse somatique, la réponse n'est pas totale puisque l'on obtient que des CER.

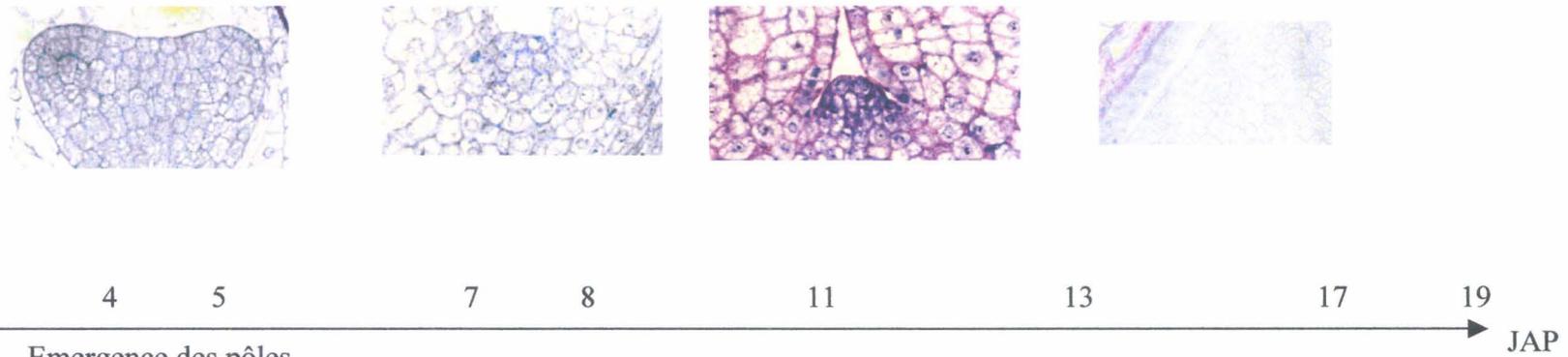
La troisième partie du travail a été consacrée à l'étude de l'expression des transcrits *CiCLV1p* et *CiSTM* au cours des embryogenèses zygotique et somatique chez la chicorée, par RT PCR en temps réel. Cette technique permet une quantification relative des transcrits cibles par rapport aux transcrits d'un gène contrôle. Nous nous sommes donc référés à la littérature et avons choisi des gènes contrôles classiquement utilisés comme les gènes *18S*. De plus nous disposions d'une séquence partielle d'*actine* de chicorée qui nous a permis de définir des amorces de PCR en temps réel.

Les premiers résultats d'hybridation de puces à ADN de chicorée obtenus au laboratoire (Thèse S. Legrand) indiquent que l'expression du gène contrôle *actine* est stable au cours de la phase d'induction de l'embryogenèse somatique pour les génotypes K59 et C15. Ces données ne sont pas encore disponibles pour la cinétique d'embryogenèse zygotique. Il semble que l'expression des gènes *18S* augmente au cours de l'embryogenèse zygotique et reste relativement stable lors de la phase d'induction de l'embryogenèse somatique.

Les interprétations des résultats ont été faites de façon systématique avec les deux gènes contrôles. Les résultats obtenus avec les deux contrôles étaient similaires à quelques variations près. Les figures 78 et 79 proposent un récapitulatif des profils d'expression des gènes *CiSTM* et *CiCLV1p* en relation avec les figures cytologiques observées au cours des embryogenèses zygotique et somatique.

Au niveau cytologique, dans l'embryon zygotique de chicorée, on note la présence entre les cotylédons de petites cellules à cytoplasme dense et isodiamétriques dès 7 jap. Ces cellules pourraient être assimilées aux initiales du méristème. Ces cellules ne sont pas encore visibles à 5 jap, alors que l'embryon est à un stade de transition globulaire / cordiforme. A 9

C
Y
T
O
L
O
G
I
E



Emergence des pôles
cotylédonaire

Organisation d'un dôme
Mise en place des procambiums

Nombreuses divisions anticlines

Accumulations de réserves

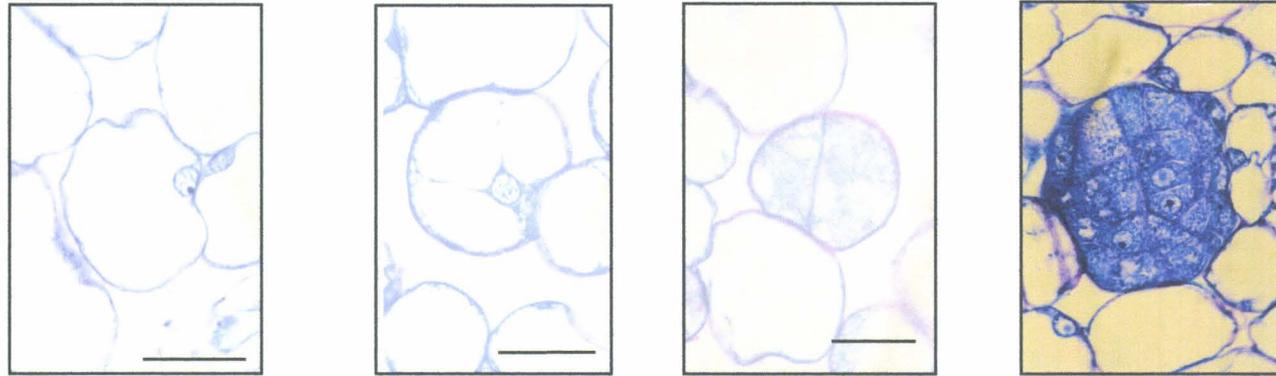
T
R
A
N
S
C
R
I
T
S

CiSTM

CiCLV1p

Figure 78: Récapitulatif des profils d'expression des transcrits *CiCLV1p* et *CiSTM* au cours de l'embryogenèse zygotique de la chicorée.

C
Y
T
O
L
O
G
I
E

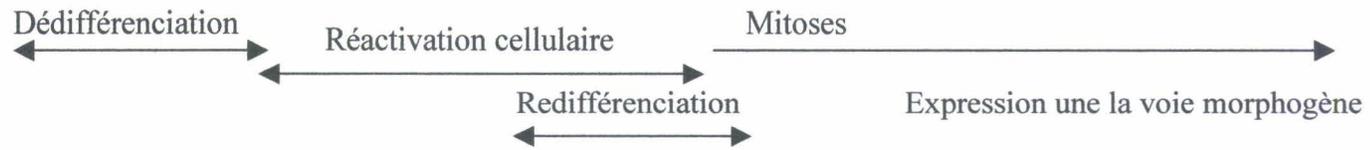


J3

J4

J5

J8



T
R
A
N
S
C
R
I
T
S

CiSTM

CiCLV1p

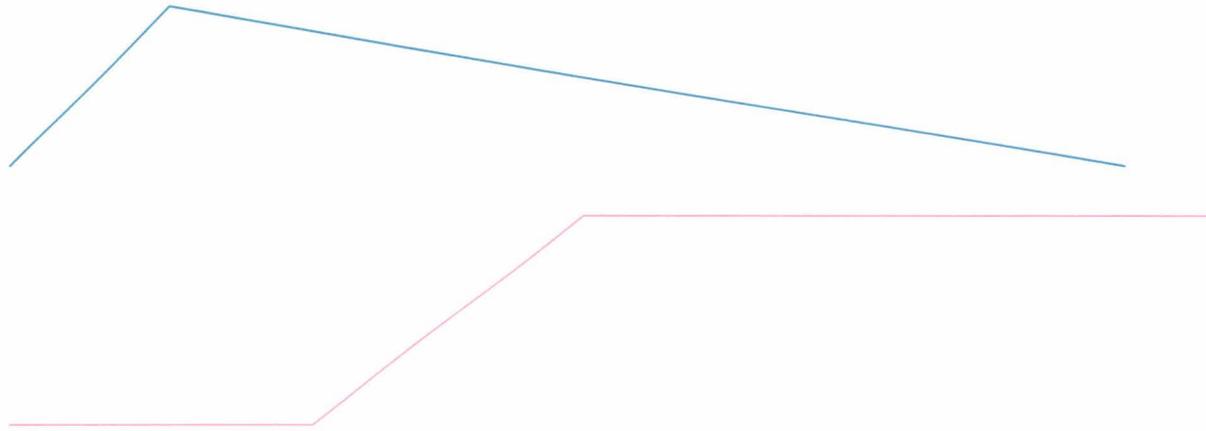


Figure 79 : Récapitulatif des profils d'expression des transcrits *CiCLV1p* et *CiSTM* au cours de l'embryogenèse somatique de la chicorée.

Discussion

jap, le dôme méristématique est clairement visible. Parallèlement, les QR de transcrits *CiCLV1p* et *CiSTM* augmentent de façon significative à partir de 9 jap et restent stables jusqu'à 17 jap.

Dans l'embryon zygotique d'*Arabidopsis thaliana*, les transcrits *AtCLV1* ne sont pas détectés avant le stade cotylédonnaire dans le méristème apical présomptif puis sont exprimés dans la couche L3 du méristème (Clark *et al.*, 1997). Le profil d'expression des transcrits *CiCLV1p* n'est donc pas en contradiction avec le profil des transcrits *AtCLV1* chez *Arabidopsis*.

De même, dans l'embryon zygotique chez *Arabidopsis thaliana*, les transcrits *AtSTM* apparaissent avant l'initiation du méristème apical et s'accumulent dans les cellules initiales du méristème, à partir du stade globulaire moyen dans une ou deux cellules. Au stade cœur, torpille et embryon mature, l'expression est restreinte à la base des cotylédons. *CiSTM* suit ainsi un profil d'expression très similaire à celui de *AtSTM* (Long *et al.*, 1996).

A partir de 13 jap, nous avons observé dans les cellules des cotylédons une accumulation de réserves. Cette accumulation de réserves dans l'embryon peut être corrélée à la diminution des QR de *CiSTM* et *CiCLV1p* observée tardivement. En effet, il est probable que la phase d'organogenèse soit terminée lorsque l'embryon atteint le stade cotylédonnaire 2 et que la phase de maturation embryonnaire ait commencé. Cette phase est marquée par la synthèse de substances de réserves, une dessiccation poussée puis le quasi-arrêt de l'activité métabolique.

Les mêmes profils ont ensuite été étudiés aux différents jours de la culture en conditions embryogènes. Les résultats sont à nouveau comparés aux figures cytologiques observées lors de la culture de fragments foliaires des géotypes C15 et K59.

Les résultats sont particulièrement intéressants pour le géotype K59 qui est le géotype le plus embryogène et qui montre une induction de l'expression des gènes *CiSTM* et *CiCLV1p*.

L'expression différentielle des gènes *CiSTM* et *CiCLV1p* chez le géotype K59 a été comparée au nombre des CR au cours de la culture. Ces CR sont assimilables à des cellules méristématiques. Chez le géotype K59, le pic de CR est obtenu aux quatrième et cinquième jours de culture. Au cours de la culture de fragments foliaires du géotype K59, quel que soit le gène contrôle, on note une induction dès le J4-J5 de culture de l'expression du gène *CiCLV1p*. Les QR de transcrits *CiSTM* augmentent de façon transitoire au cours de la culture embryogène chez le géotype K59 et présentent un pic maximum d'accumulation à J3. Selon Clark *et al.* (1996), *AtSTM* chez *Arabidopsis* est nécessaire à l'initiation du MAC embryonnaire, c'est à dire



Discussion

nécessaire à la mise en place et au maintien d'un groupe de cellules méristématiques en division. Dans nos conditions, *CiSTM* semble être nécessaire à la reprogrammation génétique des cellules foliaires qui repassent par l'état méristématique, ou cellule réactivée, pour se diviser et donner des zones de division denses et vacuolisées.

Les travaux de Gallois *et al.*, (2002) viennent compléter notre hypothèse. En effet, ils ont attribué un rôle à la fonction *STM* combinée à la fonction *WUS* de déclencheur d'organogenèse chez *Arabidopsis*. Ce processus n'est pas complètement le même que celui au cours duquel une cellule somatique change son identité pour revenir à un état méristématique, mais les bourgeons obtenus sont issus d'une réponse à différents stimuli. Au cours de l'embryogenèse somatique les cellules qui se dédifférencient sont aussi soumises à différents stimuli. D'autre part, les travaux de Zuo (Zuo *et al.*, 2002) ont montré que le produit du gène *WUS* agit comme un stimulateur du passage de la cellule de l'état végétatif vers un état embryogène chez *Arabidopsis*. Ce résultat est intéressant puisqu'il suggère que *WUS* n'est pas seulement impliqué dans le maintien du méristème mais qu'il joue aussi un rôle important dans l'embryogenèse en régulant les cellules souches au cours de l'embryogenèse et du développement post embryonnaire.

Chez le génotype C15 cultivé en condition embryogène, les QR de transcrits *CiCLV1p* ne varient pas de façon significative et il semble que l'expression du gène *CiSTM* diminue au cours de la cinétique. Ces résultats sont cohérents avec les résultats de cytologie puisque au cours de la culture de fragments foliaires, seules des CER ont été observées et au cours de la culture de fragments racinaires, seules des CER et de rares ZV ont été observées.

Cependant, il existe une interprétation délicate des résultats. En effet, la QR de transcrits *CiSTM* est 13 fois plus importante chez le génotype C15 que chez K59 au J0.5, ceci étant observé pour les deux références. Il est possible de remettre ces valeurs en question. En effet, il nous faudrait d'autres échantillons biologiques pour confirmer la validité de ce résultat. Cependant, cette différence n'est observée pour aucune autre cible testée au laboratoire ni pour les contrôles *Actine* et *18S*. De plus, le gène *STM* n'est jusqu'alors pas connu pour être impliqué dans les phénomènes de réponse au stress, notamment lors de la mise en culture. Cette différence importante d'expression après douze heures n'est pas explicable pour l'instant d'autant plus que les transcrits des deux gènes n'ont pas été détectés de façon significative chez les deux génotypes au moment de la mise en culture (J0). On peut cependant émettre une hypothèse sur l'état physiologique des explants au moment de la mise en culture. A nouveau,

Discussion

des répétitions biologiques nous permettraient d'amener une partie de la réponse.

Les gènes *CLV* dont *CLV1* sont nécessaires chez *Arabidopsis thaliana* pour empêcher la prolifération cellulaire au sein du méristème et favoriser la production de primordia d'organes. Si on considère que le gène *CiCLV1* a une fonction proche ou similaire à celle du gène *AtCLV1*, le rôle potentiel de ce gène serait, au cours de l'embryogenèse somatique de la chicorée, de réguler le passage des CR vers les ZD et les ZV, c'est à dire favoriser l'engagement des CR vers une voie de différenciation. Cette hypothèse est argumentée par le fait que l'on observe dans des fragments foliaires cultivés en condition embryogène des ZD de façon significative à J5 de la culture et dès J4 comme événements rares, et des ZV à J8.

Les résultats de comparaison des niveaux de transcrits entre les deux processus ont montré que les transcrits *CiSTM* et *CiCLV1p* sont toujours présents en quantité très supérieure au cours de l'embryogenèse zygotique par rapport aux niveaux observés au cours de l'embryogenèse somatique. Ces résultats peuvent s'expliquer du fait de la faible quantité des CER qui évoluent en CR dans les feuilles cultivées en conditions embryogènes. Si l'on suppose que les gènes *CiSTM* et *CiCLV1p* s'expriment dans les CR, le niveau de transcrit est donc dilué par rapport à la quantité de cellules qui ne répondent pas. De plus dans les ovaires (J0ap), on retrouve un niveau de base supérieur à celui des feuilles cultivées en condition embryogène. Ce résultat peut s'expliquer par le fait que le gène *AtSTM* est exprimé dans la paroi de l'ovaire chez *Arabidopsis thaliana* (Reiser *et al.*, 2000). Le niveau de base des transcrits *CiCLV1p* est aussi plus élevé dans les ovaires mais l'expression du gène *AtCLV1* ou d'un gène proche n'a pas été mentionné dans la bibliographie.

Les résultats obtenus au cours de l'embryogenèse zygotique et somatique de la chicorée sont cohérents. En effet, au cours de l'embryogenèse somatique, les transcrits *CiSTM* et *CiCLV1p* sont exprimés de façon différentielle au moment où les cellules se réactivent puis se divisent. En effet, l'augmentation de la QR des transcrits *CiSTM* précède l'augmentation de la QR des transcrits *CiCLV1p*. Au cours de l'embryogenèse zygotique, les mêmes transcrits sont exprimés à partir du moment de (ou juste avant) l'apparition d'un dôme méristématique entre les cotylédons. Ces résultats suggèrent ainsi une relation étroite entre les mécanismes qui contrôlent l'identité cellulaire dans l'embryon zygotique et les processus de dédifférenciation / redifférenciation qui interviennent lors de l'embryogenèse somatique.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Conclusion et Perspectives

L'objectif de l'étude présentée dans ce manuscrit était de déterminer si des gènes apparentés à *AtCLV1* et *AtSTM*, impliqués dans l'identité cellulaire et l'intégrité du méristème pourraient jouer un rôle dans les mécanismes de dédifférenciation / redifférenciation au cours de phases précoces de l'embryogenèse somatique de la chicorée. Ce travail se découpait donc en trois parties.

La première partie a été consacrée au clonage des ADNc *CiSTM* et *CiCLV1p* chez la chicorée. La stratégie appliquée a été l'utilisation d'amorces dégénérées déduites à partir de blocs de séquences conservées. Cette stratégie a été dans les deux tentatives efficace puisque deux ADNc dont un partiel ont été clonés. Le clonage de l'ADNc complet *CiSTM* a nécessité plusieurs étapes mais s'est avéré assez aisé. Par contre, le clonage de l'ADNc complet *CiCLV1* n'a pas eu être mené jusqu'à la fin. En effet, la technique de PCR inverse n'était pas appropriée à des ADNc de telle longueur. A l'issue des résultats d'expression, il semble intéressant de terminer le clonage de l'ADNc complet *CiCLV1*.

Suite à cette étape de clonage, les homologies des différents ADNc ont été recherchées. Pour les deux séquences obtenues, les différentes régions conservées caractéristiques ont pu être replacées sur les séquences. L'homologie entre les séquences protéiques *AtSTM* et *CiSTM* est peu discutable. En effet, l'arbre phylogénétique, construit à partir de séquences de type KNOTTED, classe *CiSTM* dans le groupe STM. En ce qui concerne l'homologie entre *AtCLV1* et *CiCLV1p*, l'interprétation est plus difficile. D'une part, nous ne disposons pas de la séquence complète. D'autre part, l'homologie la plus forte de *CiCLV1p* a été trouvée pour une séquence "AtCLV1-like". Des analyses de phylogénie ont montré que *CiCLV1* n'est probablement pas l'orthologue de *AtCLV1*, mais il est possible que ce gène assure une fonction proche ou similaire à celle du gène *AtCLV1* chez la chicorée.

Par ailleurs, si l'on regarde les résultats obtenus à l'issue de l'étape 1 du clonage de *CiCLV1p* (Figure 41), les identités des séquences consensus des trois groupes identifiés, avec la séquence *AtCLV1* étaient toutes supérieures à 75%, et les homologies étaient très fortes avec d'autres protéines classées dans le groupe de *AtCLV1*. Il serait alors intéressant de repartir des séquences des deux autres groupes qui n'ont pas été exploitées afin de poursuivre le clonage des ADNc correspondants.

Conclusion et perspectives

La deuxième partie du travail a été consacrée à la caractérisation cytologique des principaux stades de l'embryogenèse zygotique de la chicorée et à l'identification de nouveaux génotypes de chicorées embryogène et non embryogène.

Les stades principaux de l'embryogenèse zygotique ont pu être identifiés chez la chicorée. Les stades cotylédonaire 1 et 2 ont été différenciés chez la chicorée, le stade 1 étant caractérisé par les extrémités des cotylédons qui ne touchent pas le sommet de l'akène, le stade 2 par les extrémités des cotylédons qui touchent le sommet de l'akène. Une accumulation de réserves, encore non identifiées à ce jour, a été constatée dans les cellules des cotylédons à partir de 13 jap. Les territoires présomptifs des MAC et MAR ont pu être localisés sur les coupes d'embryons. Nous n'avons pas pu identifier les trois couches L1, L2 et L3 caractéristiques de la structure du MAC chez la chicorée. Il serait alors intéressant de poursuivre cette étude par un suivi plus précis de la mise en place du MAC embryonnaire en réalisant des coupes histologiques à partir de 8 jap, la difficulté étant de se placer au niveau du plan de coupe permettant de localiser ces trois couches cellulaires en même temps. Chez *Arabidopsis*, le MAC est mis en place à la transition entre les stades globulaire et torpille. Chez la chicorée, un dôme apical est nettement visible entre 7 et 8 jap dans l'embryon. La coiffe est quant à elle mise en place autour de 7 jap.

Les deux génotypes de chicorée sélectionnés ont ensuite été caractérisés cytologiquement : il s'agit du génotype K59 choisi comme embryogène et du génotype C15 choisi comme non embryogène. Ces choix ont été réalisés à partir de comptages de figures cytologiques obtenues après culture embryogène de fragments foliaires et racinaires de ces deux génotypes. Un référentiel de figures cytologiques a été proposé après des observations des différentes coupes colorées. A la différence des figures classiquement observées chez la chicorée "474", des ZD et ZV sont définies dans ce référentiel, les zones denses produisant des embryons et des bourgeons, les ZV donnant majoritairement des nodules et des zones de prolifération. Il a été observé chez la chicorée une embryogenèse somatique secondaire sur des nodules et des zones de prolifération. Il serait alors intéressant de réaliser des observations aux jours tardifs de la cinétique (période J15-J30) de manière à estimer à quelle fréquence on observe de l'embryogenèse somatique secondaire à partir de ces zones vacuolisées.

De plus, des fragments racinaires et foliaires du génotype C15 cultivés en condition embryogène produisent des CER en quantité non négligeable. Ce génotype est capable de produire de l'organogenèse *in vitro*, il serait donc intéressant de réaliser une étude cytologique du bourgeonnement chez le génotype C15. En changeant les conditions de culture, ce

Conclusion et perspectives

génotype produit des zones de division à l'origine des bourgeons, la question posée alors est de savoir si les zones de division obtenues en condition organogène ont la même organisation que les ZD obtenues chez le génotype K59 en condition embryogène.

Au cours de la troisième partie, l'étude du profil d'expression des transcrits *CiSTM* et *CiCLV1p* par PCR en temps réel au cours de l'embryogenèse zygotique a montré une implication possible de ces gènes lors de la mise en place des initiales méristématiques avec une induction significative 8 jap.

Cependant, des amorces de PCR en temps réel pourraient être redéfinies dans les régions UTR que nous avons obtenues à la fin de l'étude, pour augmenter la spécificité d'amplification. Les amplifications ont cependant permis d'établir un profil d'expression temporel de nos candidats. Pour préciser nos résultats, il reste alors à réaliser des hybridations *in situ* de manière à localiser nos transcrits dans les territoires présomptifs méristématiques identifiés au cours des analyses cytologiques. Cette localisation permettrait de préciser dans quelle mesure les gènes *CiSTM* et *CiCLV1p* peuvent être considérés comme des équivalents fonctionnels de *AtSTM* et *AtCLV1*.

Au cours de l'embryogenèse somatique, les transcrits *CiSTM* et *CiCLV1p* montrent une induction significative au troisième jour de culture chez le génotype K59. Cette induction semble corrélée à l'apparition des CER/CR chez ce dernier. Des hybridations *in situ* permettraient de confirmer cette relation et de déterminer le(s) type(s) cellulaires qui expriment ces deux gènes.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- Aida, M., T. Ishida and M. Tasaka (1999). "Shoot apical meristem and cotyledon formation during *Arabidopsis* embryogenesis: interaction among the CUP-SHAPED COTYLEDON and SHOOT MERISTEMLESS genes." *Development* 126(8): 1563-1570.
- Autran, D. and J. Traas (2001). "Organisation et fonctionnement des cellules souches végétales : le méristème apical d'*Arabidopsis*." *Médecine/Sciences* 17: 836-844.
- Barton, M. K. and R. S. Poethig (1993). "Formation of the shoot apical meristem in *Arabidopsis thaliana*: an analysis of development in the wild type and in the *shoot meristemless* mutant." *Development* 119: 823-831.
- Batel, L. (2000). "Effets des molécules endogènes et exogènes sur l'embryogénèse somatique de l'hybride "474" et de chicorées récalcitrantes." DEA.
- Baud, S., J.-P. Boutin, M. Miquel, L. Lepiniec and C. Rochat (2002). "An integrated overview of seed development in *Arabidopsis thaliana* ecotype WS." *Plant Physiology and Biochemistry* 40: 151-160.
- Becraft, P. W. (1998). "Receptor kinases in plant development." *Trends Plant Sci* 3(10): 384-388.
- Belletre, A., J. P. Couillerot, A. S. Blervacq, S. Aubert, E. Gout and J. Vasseur (2001). "Glycerol alters cytoskeleton and is metabolised during somatic embryogenesis in *Cichorium* leaves." *Plant Physiology and Biochemistry* 39: 503-511.
- Belletre, A., J. P. Couillerot and J. Vasseur (1999). "Effects of glycerol on somatic embryogenesis in *Cichorium* leaves." *Plant Cell Report* 19.
- Berleth, T. (1998). "Experimental approaches to *Arabidopsis* embryogenesis." *Plant Physiology and Biochemistry* 36: 69-82.
- Bharathan, G., B.-J. Janssen, E. A. Kellog and N. Sinha (1999). "Phylogenetic Relationships and Evolution of the KNOTTED Class of Plant Homeodomain Proteins." *Molecular Biology of Evolution* 16(4): 553-563.
- Blervacq, A. S., T. Dubois and J. Vasseur (1995). "First divisions of somatic embryogenic cells in *Cichorium* hybrid "474"." *Protoplasma* 186: 163-168.
- Bowman, J. (1994). "ARABIDOPSIS: An Atlas of Morphology and Development." (New York: Spinger-Verlag).
- Bowman, J. L. (2000). "Axial patterning in leaves and other lateral organs." *Current Opinion in Genetic Development*. 10: 399-404.
- Boyer, C., J.-L. Hilbert and J. Vasseur (1993). "Embryogenesis-related protein synthesis and accumulation during early acquisition of somatic embryogenesis competence in *Cichorium*." *Plant Science* 93: 41-53.

- Brand, U., J. C. Fletcher, M. Hobe, E. M. Meyerowitz and R. Simon (2000). "Dependence of stem cell fate in Arabidopsis on a feedback loop regulated by CLV3 activity." *Science* 289(5479): 617-619.
- Chapman, A., A. S. Blervacq, J. Vasseur and J. L. Hilbert (2000). "Arabinogalactan-proteins in Cichorium somatic embryogenesis: effect of beta-glucosyl Yariv reagent and epitope localisation during embryo development." *Planta* 211(3): 305-314.
- Chuck, G., C. Lincoln and S. Hake (1996). "*KNAT1* induces lobed leaves with ectopic meristems when overexpressed in *Arabidopsis*." *Plant Cell* 8: 1277-1289.
- Clark, S. E., S. E. Jacobsen, J. Z. Levin and E. M. Meyerowitz (1996). "The CLAVATA and SHOOT MERISTEMLESS loci competitively regulate meristem activity in Arabidopsis." *Development* 122(5): 1567-1575.
- Clark, S. E., M. P. Running and E. M. Meyerowitz (1993). "CLAVATA1, a regulator of meristem and flower development in Arabidopsis." *Development* 119(2): 397-418.
- Clark, S. E., M. P. Running and E. M. Meyerowitz (1995). "CLAVATA3 is a specific regulator of shoot and floral meristem development affecting the same processes as CLAVATA1." *Development* 121: 2057-2067.
- Clark, S. E., R. W. Williams and E. M. Meyerowitz (1997). "The CLAVATA1 gene encodes a putative receptor kinase that controls shoot and floral meristem size in Arabidopsis." *Cell* 89(4): 575-585.
- de Jong, A. J., J. Cordewener, F. Lo Schiavo, M. Terzi, J. Vandekerckhove, A. van Kammen and S. C. de Vries (1992). "A carrot somatic embryo mutant is rescued by chitinase." *Plant Cell* 4(4): 425-433.
- de Vries, S. C., H. Booij, R. Janssens, R. Vogels, L. Saris, F. Lo Schiavo, M. Terzi and A. van Kammen (1988). "Carrot somatic embryogenesis depends on the phytohormone-controlled presence of correctly glycosylated extracellular protein." *Planta* 2: 462-476.
- Décout, E., T. Dubois, M. Guedira, J. Dubois, J.-C. Audran and J. Vasseur (1994). "Role of temperature as a triggering signal for organogenesis or somatic embryogenesis in wounded leaves of chicory cultured *in vitro*." *Journal of Experimental Botany* 45(281): 1859-1865.
- Dockx, J., N. Quaedvieg, G. Keultjes, P. Kock, P. Weisbeek and S. Smeekens (1995). "The homeobox gene *ATK1* of *Arabidopsis thaliana* is expressed in the shoot apex of the seedling and in flowers and inflorescence stems of mature plants." *Plant Molecular Biology* 28: 723-737.
- Dodeman, V. L., M. Le Guilloux, G. Ducreux and D. de Vienne (1998). "Characterization of storage proteins in *Daucus carota* L.: two novel proteins display zygotic embryo specificity." *Plant Cell Physiol* 39(1): 49-56.

- Dodeman, V. L., M. Le Guilloux, G. Ducreux and D. de Vienne (1998). "Somatic and zygotic embryos of *Daucus carota* L. display different protein patterns until conversion to plants." *Plant Cell Physiol* 39(10): 1104-1110.
- Domon, J. M., B. Dumas, E. Lainé, Y. Meyer, A. David and H. David (1995). "Three glycosylated polypeptides secreted by several embryogenic cell cultures of pine show highly specific serological affinity to antibodies directed against the wheat germin apoprotein monomer." *Plant Physiology* 108: 141-148.
- Domon, J. M., Y. Meyer, L. Faye, A. David and H. David (1994). "Extracellular (glyco)proteins in embryonic and non-embryonic cell lines of Caribbean pine. Comparison between phenotypes of stage one somatic embryos." *Plant Physiology Biochemistry* 32: 137-147.
- Duban, M. (2000). "Clonage et expression de gènes codant des récepteurs de type kinase au cours du processus d'induction de l'embryogenèse somatique de la chicorée." DEA.
- Dubois, J., M. Guedira, J. Dubois and J. Vasseur (1991). "Direct somatic embryogenesis in leaves of *Cichorium*, A histological and SEM study of early stages." *Protoplasma* 162: 120-127.
- Dubois, T., J. Dubois, M. Guedira, A. Diop and J. Vasseur (1992). "SEM Characterisation of an Extracellular Matrix Around Somatic Proembryos in Roots of *Cichorium*." *Annals of Botany* 70: 119-124.
- Dubois, T., J. Dubois, M. Guedira and J. Vasseur (1988). "Embryogenèse somatique directe sur les styles de *Cichorium*: effets de la température et origine des embryoïdes." *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences Paris* 307: 669-675.
- Dubois, T., M. Guedira, J. Dubois and J. Vasseur (1990). "Direct somatic embryogenesis in roots of *Cichorium*: is callose an early marker?" *Ann Bot* 65: 539-545.
- Endrizzi, K., B. Moussian, A. Haecker, J. Z. Levin and T. Laux (1996). "The *SHOOT MERISTEMLESS* gene is required for maintenance of undifferentiated cells in *Arabidopsis* shoot and floral meristems and acts at a different regulatory level than the meristem genes *WUSCHEL* and *ZWILLE*." *Plant Journal*.
- Faure, J.-E., N. Rotman, P. Fortuné and C. Dumas (2002). "Fertilization in *Arabidopsis thaliana* wild type: Developmental stages and time course." *The Plant Journal* 30(4): 481-488.
- Fletcher, J. C. (2002). "Shoot and Floral Meristem Maintenance in *Arabidopsis*." *Annu.Rev.Plant Physiol Plant Mol.Biol.* 53: 45-66.
- Fletcher, J. C., U. Brand, M. P. Running, R. Simon and E. M. Meyerowitz (1999). "Signaling of cell fate decisions by *CLAVATA3* in *Arabidopsis* shoot meristems." *Science* 283(5409): 1911-1914.
- Fournier, E. (2004). "Isolement et expression de gènes contrôlant le cycle cellulaire lors de l'induction de l'embryogenèse somatique chez la chicorée." DEA.

- Galland, R., B. Randoux, J. Vasseur and J. L. Hilbert (2001). "A glutathione S-transferase cDNA identified by mRNA differential display is upregulated during somatic embryogenesis in *Cichorium*." *Biochimica and Biophysica Acta* 1522(3): 212-216.
- Gallois, J.-L., C. G. Woodward, R. Venugopala and R. Sablowski (2002). "Combined SHOOT MERISTEMLESS and WUSCHEL trigger ectopic organogenesis in *Arabidopsis*." *Development* 129: 3207-3217.
- Golz, J. F. and A. Hudon (Supplement 2002). "Signaling in Plant Lateral Organ Development." *The Plant Cell*: S277-S288.
- Guedira, M., T. Dubois-Tylski, J. Vasseur and J. Dubois (1989). "Embryogenèse somatique directe à partir de culture d'anthères du genre *Cichorium* (Asteraceae)." *Canadian Journal of Botany* 67: 970-976.
- Györgyey, J., A. Gartner, K. Nemeth, Z. Magyar, H. Hirt, E. Herbele-Bors and D. Dudits (1991). "Alfalfa heat shock genes are differentially expressed during somatic embryogenesis." *Plant Molecular Biology* 16: 999-1007.
- Habarugira, I. (2004). "Potentiels morphogènes des génotypes de *Cichorium intybus* population Kospol en relation avec la sécrétion d'AGPs (ArabinoGalactan Proteins) dans le milieu de culture." DEA.
- Haensch, K.-T. (2004). "Morpho-histological study of somatic -like structures in hypocotyl cultures of *Pelargonium x hotorum* Bailey." *Plant Cell Report* 22(376-381).
- Harada, J. J. (1999). "Signaling in plant embryogenesis." *Current Opinion in Plant Biology*. 2: 23-27.
- Helleboid, S., G. Bauw, L. Belingheri, J. Vasseur and J. L. Hilbert (1998). "Extracellular beta-1,3-glucanases are induced during early somatic embryogenesis in *Cichorium*." *Planta* 205(1): 56-63.
- Helleboid, S., J.-P. Couillerot, J.-L. Hilbert and J. Vasseur (1995). "Inhibition of direct somatic embryogenesis by alpha-difluoromethylarginine in a *Cichorium* hybrid: effects on polyamine content and proteins patterns." *Planta* 196: 571-576.
- Hendriks, T., I. Scheer, M. C. Quillet, B. Randoux, B. Delbreil, J. Vasseur and J. L. Hilbert (1998). "A nonsymbiotic hemoglobin gene is expressed during somatic embryogenesis in *Cichorium*." 1443(1-2): 193-197.
- Hilbert, J. L., T. Dubois and J. Vasseur (1992). "Detection of embryogenesis-related proteins durin somatic embryo formation in *Cichorium*." *Plant Physiology and Biochemistry* 30(6): 733-741.
- Hiwatashi, Y. and H. Fukuda (2000). "Tissue-specific localization of mRNA for carrot homeobox genes, CHBs, in carrot somatic embryos." *Plant Cell Physiol* 41(5): 639-643.

- Howell, S. H. (1998). "Molecular genetics of plant development." Cambridge University Press.
- Jackson, D., B. Veit and S. Hake (1994). "Expression of maize KNOTTED1 related homeobox genes in the shoot apical meristem predicts patterns of morphogenesis in the vegetative shoot." *Development* 120: 405-413.
- Jeong, S., A. E. Trotochaud and S. E. Clark (1999). "The Arabidopsis CLAVATA2 gene encodes a receptor-like protein required for the stability of the CLAVATA1 receptor-like kinase." *Plant Cell* 11(10): 1925-1934.
- Jürgens, G., R. A. Torrez-Ruiz, T. Laux, U. Mayer and T. Berleth (1994). "Early events in apical-basal pattern formation in *Arabidopsis*." Coruzzi G., Puigdomènech P. (eds), *Plant Molecular Biology: Molecular-Genetic Analysis of Plant Development and Metabolism*. Springer-Verlag, Berlin: 95-103.
- Kawahara, R., A. Komamine and H. Fukuda (1995). "Isolation and characterization of homeobox-containing genes of carrot." *Plant Molecular Biology* 27(1): 155-164.
- Kayes, J. M. and S. E. Clark (1998). "CLAVATA2, a regulator of meristem and organ development in Arabidopsis." *Development* 125(19): 3843-3851.
- Kerstetter, R., E. Vollbrecht, B. Lowe, B. Veit, J. Yamaguchi and S. Hake (1994). "Sequence analysis and expression pattern divide the maize knotted-1-like homeobox genes into two classes." *Plant Cell* 6: 1877-1887.
- Kim, C., D. H. Jeong and G. An (2000). "Molecular cloning and characterization of OsLRK1 encoding a putative receptor-like protein kinase from *Oryza sativa*." *Plant Cell* 12(1): 17-26.
- Kobe, B. and A. V. Kajava (2001). "The Leucine-rich repeat as a protein recognition motif." *Current Opinion in Structural Biology*. 11: 725-732.
- Komamine, A., R. Kawahara, M. Matsumoto, S. Sunabori, T. Toya, A. Fujiwara, M. Tsukahara, J. Smith, H. Fukuda, K. Nomura and T. Fujimura (1992). "Mechanisms of somatic embryogenesis in cells cultures: physiology, biochemistry, and molecular biology." *In vitro Cellular and Developmental Biology* 28P: 11-14
- Koornneef, M., van Heden J., Hanhart C.J., Stam P., Braaksma F.J., Feenstra W.J. (1983). "Linkage map of *Arabidopsis thaliana*." *Journal of Heredity* 74: 265-272.
- Kreuger, M. and G. J. Van Holst (1995). "Arabinogalactan-protein epitopes in somatic embryogenesis of *Daucus carota* L." *Planta* 197: 135-141.
- Laux, T. and G. Jürgens (1997). "Embryogenesis: A New Start in Life." *The Plant Cell* 9: 989-1000.
- Laux, T., K. F. Mayer, J. Berger and G. Jürgens (1996). "The WUSCHEL gene is required for shoot and floral meristem integrity in Arabidopsis." *Development* 122(1): 87-96.

- Lenhard, M., G. Jurgens and T. Laux (2002). "The WUSCHEL and SHOOTMERISTEMLESS genes fulfil complementary roles in Arabidopsis shoot meristem regulation." *Development* 129(13): 3195-3206.
- Lincoln, C., J. A. Long, J. Yamaguchi, K. Serikawa and S. Hake (1994). "A knotted1-like homeobox gene in Arabidopsis is expressed in the vegetative meristem and dramatically alters leaf morphology when overexpressed in transgenic plants." *Plant Cell* 6: 1859-1876.
- Lo Schiavo, F., G. Giuliano, S. C. de Vries, A. Genga, R. Bollini, L. Pitto, F. Cozzani, V. Nuti-Ronchi and M. Terzi (1990). "A carrot cell variant temperature-sensitive for somatic embryogenesis reveals a defect in the glycosylation of extracellular proteins." *Molecular and General Genetics* 223: 385-393.
- Long, J. A., E. I. Moan, J. I. Medford and M. K. Barton (1996). "A member of the KNOTTED class of homeodomain proteins encoded by the *STM* gene of *Arabidopsis*." *Nature* 379(66-69): 66-69.
- Ma, H., M. D. McMullen and J. J. Finer (1994). "Identification of a homeobox-containing gene with enhanced expression during soybean (*Glycine max* L.) somatic embryo development." *Plant Molecular Biology* 24(3): 465-473.
- Maniatis, T., E. F. Fritsch and J. Sambrook (1982). "Molecular cloning: a laboratory manual. ed. Cold Spring Harbor, N.Y. ISBN 0-87969-136-0."
- Mayer, K. F., H. Schoof, A. Haecker, M. Lenhard, G. Jurgens and T. Laux (1998). "Role of WUSCHEL in regulating stem cell fate in the Arabidopsis shoot meristem." *Cell* 95(6): 805-815.
- Michaux-Ferrière, N., H. Grout and M. P. Carron (1992). "Origin and ontogenesis of somatic embryos in *Hevea brasiliensis* (Euphorbiaceae)." *Annual Journal of Botany* 79: 174-180.
- Mordhorst, A. P., K. J. Voerman, M. V. Hartog, E. A. Meijer, J. van Wente, M. Koornneef and S. C. de Vries (1998). "Somatic embryogenesis in *Arabidopsis thaliana* is facilitated by mutations in genes repressing meristematic cell divisions." *Genetics* 149(2): 549-563.
- Moussian, B., H. Schoof, A. Hacker, G. Jürgens and T. Laux (1998). "Role of Zwillig gene in the regulation of central shoot meristem cell fate during *Arabidopsis* embryogenesis." *The Embo Journal* 17(6): 1799_1809.
- Pautot, V., J. Dockx, O. Hamant, J. Kronenbrger, O. Grandjean, D. Jublot and J. Traas (2001). "KNAT2: Evidence for a link between Knotted-like genes and carpel development." *Plant Cell* 13: 1719-1734.
- Poulain, J. (2003). "Etude du rôle de gènes contrôlant le cycle cellulaire au cours du développement racinaire de *Cichorium intybus* L. Isolement et caractérisation d'une cycline mitotique de type B de chicorée." Thèse.

- Randoux, B., M. C. Quillet, C. Rambaud, J. Vasseur and J. L. Hilbert (2002). "Characterisation of cDNAs homologous to Rab5-GTP binding proteins expressed during early somatic embryogenesis in chicory." *Plant Science* 162: 413-422.
- Reinert, J. M. (1959). "Morphogenese und ihre Kontrolle an Gewebekulturen aus Karotten." *Naturwissenschaft* 45: 344-345.
- Reiser, L., P. Sanchez-Baracaldo and S. Hake (2000). "Knots in the family tree: evolutionary relationships of *knox* homeobox genes." *Plant Molecular Biology* 42: 151-166.
- Robatche-Claive, A. S., J. P. Coullerot, J. Dubois, T. Dubois and J. Vasseur (1992). "Embryogenèse somatique directe dans les feuilles du *Cichorium* hybride "474": synchronisation de l'induction." *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences Paris* 111: 371-377.
- Schmidt, E. D., F. Guzzo, M. A. Toonen and S. C. de Vries (1997). "A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos." *Development* 124(10): 2049-2062.
- Schoof, H., M. Lenhard, A. Haecker, K. F. Mayer, G. Jurgens and T. Laux (2000). "The stem cell population of *Arabidopsis* shoot meristems is maintained by a regulatory loop between the *CLAVATA* and *WUSCHEL* genes." *Cell* 100(6): 635-644.
- Shicheva, L. B. (1936). "Cichorium. Bulletin of applied botany, genetics and plant breeding. New technical plants." Series 1. New cultures and questions of introduction.: 120-131.
- Shiu, S. H. and A. B. Bleecker (2003). "Expansion of the Receptor-Like Kinase/Pelle Gene Family and Receptor-Like Proteins in *Arabidopsis*^[W]." *Plant Physiology* 132: 530-543.
- Smyth, D. R., J. L. Bowman and E. M. Meyerowitz (1990). "Early flower development in *Arabidopsis*." *Plant Cell* 2: 755-767.
- Somleva, M. N., E. D. Schmidt and S. C. de Vries (2000). "Embryonic cells in *Dactylis glomerata* L. (Poaceae) explants identified by cell tracking and by SERK expression." *Plant Cell Report* 19: 718-726.
- Steeves, T. A. and I. M. Sussex (1989). "Patterns in plant development." Cambridge University Press.
- Steward, F. C., M. O. Mapes and K. Mearns (1958). "Growth and organized development of cultured cells. II : organization in cultures grown from freely suspended cells." *American Journal of Botany* 45: 705-708.
- Stirn, S. and H. J. Jacobsen (1987). "Marker proteins for embryogenic differentiation patterns in pea callus." *Plant Cell Report* 6: 50-54.
- Sung, Z. R. and R. Okimoto (1981). "Embryonic proteins in somatic embryos of carrot." *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 3683-3687.

- Tan, S.-K., K. Sage-Ono and H. Kamada (2000). "Cloning and characterization of ECPP44, a cDNA encoding a 44-kilodalton phosphoprotein relating to somatic embryogenesis in carrot." *Plant Biotechnology* 17: 61-68.
- Toonen, M. A. J., T. Hendriks, E. D. L. Schmidt, H. A. Verhoeven, A. van Kammen and S. C. de Vries (1994). "Description of somatic-embryo-forming single cells in carrot suspension cultures employing video cell tracking." *Planta* 194: 565-572.
- Trotochaud, A. E., T. Hao, G. Wu, Z. Yang and S. E. Clark (1999). "The CLAVATA1 receptor-like kinase requires CLAVATA3 for its assembly into a signaling complex that includes KAPP and a Rho-related protein [see comments]." *Plant Cell* 11(3): 393-406.
- Veit, B. (2004). "Determination of cell fate in apical meristems." *Current Opinion in Plant Biology*. 7(1): 57-64.
- West, M. and J. J. Harada (1993). "Embryogenesis in Higher Plants: An Overview." *Plant Cell* 5: 1361-1369.
- Zimmerman, J. L. (1993). "Somatic Embryogenesis: A Model for Early Development in Higher Plants." *Plant Cell* 5: 1411-1423.
- Zuo, J., Q.-W. Niu, G. Frugis and N.-H. Chua (2002). "The *WUSCHEL* gene promotes vegetative -to-embryonic transition in *Arabidopsis*." *The Plant Journal* 30(3): 349-359.

ANNEXES

ANNEXES

Annexe 1 : composition des milieux M17

Composés pour un litre	M17S60	M17S60 gly
Solution A :		
Stock A x 10	100 ml	100 ml
Microéléments de Heller (stock)	1 ml	1 ml
Vitamines Morel Wetmore (stock)	10 ml	10 ml
Inositol	100 mg	100 mg
Glutamine	250 mg	250 mg
ANA	0,02 mg	0,02 mg
2 ip	0,5 mg	0,5 mg
Saccharose	20 g QSP 700 ml	20 g QSP 600 ml
Solution B :		
Stock B x 10	100 ml	100 ml
Fer-EDTA (stock)	5 ml QSP 300 ml	5 ml QSP 300 ml
Solution C		
Glycérol		24 ml QSP 100 ml
PH (Sol A et B)	5,4	5,4

Solution stock A 10× macroéléments de Heller

	1 litre	500 ml
MgSO ₄ , 7 H ₂ O	1900 mg	925 mg
CaCl ₂ , 7 H ₂ O	2200 mg	1100 mg
NH ₄ NO ₃	8250 mg	4125 mg
KCl	7500 mg	3750 mg

Solution stock B 10× macroéléments de Heller

	1 litre	500 ml
KH ₂ PO ₄	850 mg	425 mg

Solution Stock de FeEDTA (MS)

Par litre de stock :

Na ₂ EDTA :	3,73 g
FeSO ₄ , 7H ₂ O :	2,78 g

Dissoudre séparément et dans le même volume d'eau Na₂EDTA d'une part et FeSO₄, 7H₂O d'autre part. Ajuster à 500 ml.

Verser doucement la solution de $\text{FeSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$ dans la solution Na_2EDTA en agitant et en chauffant cette dernière. Laisser en agitation pendant 1 heure.

Solution stock de vitamines de Morel et Wetmore

- Panthothénate de calcium : 20 mg
- Thiamine B1 : 20 mg
- Acide nicotinique : 20 mg
- Pyridoxine : 20 mg
- Biotine (0,1 mg/ml) : 2 ml

H_2O QSP 200 ml

Solution stock de microéléments de Heller (1953)

- $\text{ZnSO}_4, 7 \text{H}_2\text{O}$ 1 g/l
- H_3PO_4 1 g/l
- $\text{MnSO}_4, \text{H}_2\text{O}$ 0,076 g/l
- $\text{CuSO}_4, 5 \text{H}_2\text{O}$ 0,03 g/l
- $\text{AlCl}_3, 6 \text{H}_2\text{O}$ 0,05 g/l
- $\text{NiCl}_2, 6 \text{H}_2\text{O}$ 0,05 g/l
- KI 0,01 g/l

Annexe 2 : composition des milieux de Heller (H5)

Composés pour un litre	Heller	Heller gélosé
Macroéléments de Heller (stock)	100 ml	100 ml
Microéléments de Heller (stock)	1 ml	1 ml
Vitamines Morel Wetmore (stock)	10 ml	10 ml
Inositol	500 mg	500 mg
Fer-EDTA (stock)	5 ml	5 ml
Saccharose	5 g	5 g
Agar (Biokar type E)		6 g
pH	5,5	5,5

Solution stock de macroéléments de Heller 10×

- CaCl ₂	750 mg
- MgSO ₄ , 7 H ₂ O	2500 mg
- KCl	7500 mg
- NaNO ₃	6000 mg
- NaH ₂ PO ₄ , 2 H ₂ O	1413 mg

Annexe 3 : aseptisation des feuilles

Immerger les feuilles dans du Domestos® à 12% pendant 20 minutes
Rincer trois fois les feuilles à l'eau stérile

Annexe 4 : composition du milieu de bourgeonnement Bg 0,5

Composés pour un litre :

Macroéléments :

CaCl ₂ , 2H ₂ O (MS)	10 ml
MgSO ₄ , 7H ₂ O (MS)	10 ml
NH ₄ NO ₃ (MS)	10 ml
KNO ₃ (MS)	10 ml
KH ₂ PO ₄ (MS)	10 ml
Fe-EDTA (MS/2)	5 ml
Microéléments (MS) :	1 ml
Glutamine :	100 mg
Vitamines Morel Wetmore (stock) :	10 ml
Inositol :	100 mg
BAP :	0,5 mg
Saccharose :	20 g
pH	5,7

Solution stock de macroéléments de Murashige et Skoog (MS)

- CaCl ₂ , 2H ₂ O	440 mg/l
- MgSO ₄ , 7H ₂ O	370 mg/l
- NH ₄ NO ₃	1650 mg/l
- KNO ₃	1900 mg/l
- KH ₂ PO ₄	170 mg/l

Solution stock de microéléments de Murashige et Skoog (MS)

Composés pour un litre :

- H ₃ BO ₃	620 mg
- CoCl ₂ , 6 H ₂ O	2,5 mg
- CuSO ₄ , 5 H ₂ O	2,5 mg
- MnSO ₄ , H ₂ O	1690 mg
- KI	83 mg
- ZnSO ₄ , 7H ₂ O	860 mg
- Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O	25 mg

Annexe 5 : composition du FAE

Formaldéhyde/Acide Acétique/Ethanol 3,5/6,5/100 V/V/V

Annexe 6 : extraction des ARN au Tri Reagent™

- Préparer des tubes identifiés contenant 1 ml de Tri Reagent™
- Broyer environ 100 mg de tissus dans l'azote liquide
- Transférer la poudre dans les tubes, vortexer et laisser à température ambiante 5 minutes
- Ajouter 0,2 ml de chloroforme, vortexer et laisser à température ambiante 15 minutes
- Centrifuger les tubes à 12 000 g, à 4°C pendant 15 minutes
- Transférer la phase supérieure dans un nouveau tube
- Ajouter 0,5 ml d'isopropanol, et agiter
- Laisser à température ambiante 10 minutes
- Centrifuger les tubes à 12 000 g, à 4°C pendant 10 minutes
- Enlever le surnageant
- Rincer le culot d'ARN en vortexant en présence de 1 ml d'éthanol 75%
- Centrifuger les tubes à 12 000 g, à 4°C pendant 10 minutes
- Laisser sécher les culots sous une hotte à flux laminaire
- Resuspendre le culot d'ARN dans un volume minimal d'eau stérile (20 µl) (procéder sur la glace)
- Doser les ARN à 260 nm

Annexe 7 : Reverse Transcription des ARNm selon le protocole du kit " SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR" de Invitrogen

- Dans un tube, ajouter : 5 µg d'ARN, 2 µL "random hexamers" (50 ng/µL) (100 ng final) ou de polyd(T), 1 µL dNTP mix (10 mM) (0,5 mM final) et compléter à 10 µL à l'eau DEPC.
- Laisser 5 minutes à 65°C puis au moins 1 minute dans la glace.
- Ajouter: 2 µL tampon 10×, 4 µL MgCl₂ (25 mM) (5 mM final), 2 µL DTT (0,1 M) (10 mM final) et 1 µL "Rnase OUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor"
- Incuber 2 minutes 25°C
- Ajouter 1 µL SuperScript II RT (50 U/µL)
- Incuber 10 minutes 25°C puis 50 minutes 42°C
- Terminer la réaction par 15 minutes à 70°C puis refroidir sur la glace

- Ajouter 1 µL RnaseH
- Incuber 20 minutes à 37°C

Annexe 8 : Purification de produits de PCR avec le kit Qiagen "Qiaquick PCR Purification"

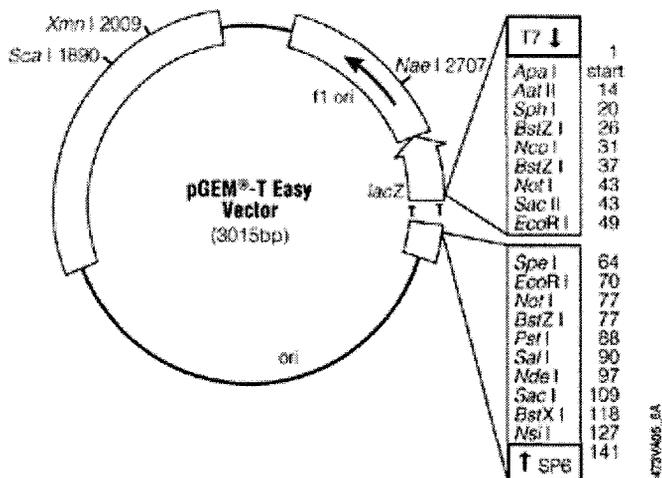
- Ajouter 5 volumes de tampon PB au volume de produits de PCR
- Placer l'ensemble dans une colonne de purification, l'ensemble est installé dans un tube de 2 ml
- Centrifuger 1 minute à 10 000 g (centrifugeuse de paille)
- Jeter l'éluât et rincer avec 0,75 ml de tampon PE
- Centrifuger 1 minute à 10 000 g
- Jeter l'éluât et centrifuger à nouveau 1 minute à 10 000 g
- Placer la colonne dans un tube propre de 1,5 ml
- Ajouter 50 µl de tampon EB d'éluition (Tris 10 mM, pH 8,5)
- Centrifuger 1 minute à 10 000 g, le volume d'éluition récupéré peut-être utilisé pour des expériences ultérieures

Annexe 9 : ligature des produits de PCR à l'aide du kit pGEM[®]-Teasy vector (Promega)

Volume par réaction	
Tampon 2×	5 µl
Vecteur pGEM-T easy	1 µl
Enzyme T4 Ligase	1 µl
ADN	max 3 µl

Ligature 12 heures à 4°C

La quantité d'ADN à liguer est donnée par la formule du paragraphe 4.5 du Matériel et Méthodes



Position des amorces M13
 M13 R : 176-192
 M13 F : 2956-2972

Carte de restriction du vecteur pGEM[®]-Teasy vector (Promega)

Annexe 10 : Composition du milieu SOC

Tryptophane	2 g
Extrait de levure	0,5 g
NaCl 1 M	1 ml
Kcl 1 M	0,25 ml
QSP 97 ml et autoclavé	

Mg ²⁺ 2 M filtré	1 ml	} A ajouter à froid Ajuster ensuite le pH à 7
Glucose 2 M filtré	1 ml	

Préparation de la solution stock de Mg²⁺ 2M

MgCl ₂ , 6 H ₂ O	101,5 g
MgSO ₄ , 7H ₂ O	123,3 g
QSP	500 ml et filtré

Annexe 11 : Composition du TTE

	Final	Volume
Triton X-100	1%	1 ml
Tris-HCl pH 8,5	20 mM	2 ml sol. stock 1 M
EDTA pH 8	2 mM	0,4 ml sol. stock 0,5 M

Annexe 12 : réactions de séquences

Kit ABI PRISM Dye Primer Cycle Sequencing Core Kit (Applied Biosystems)

Mix ddATP et ddCTP

ddATP/ ddCTP	0,5 µl
Amorce IRD 800(1 pmol/µl)	1 µl
Tampon 5×	1 µl
Mix Enzyme	0,5 µl
H ₂ O	0,75 µl
ADN (50 ng)	1,5 µl

Mix ddGTP et ddTTP

ddGTP/ ddTTP	1 µl
Amorce IRD 800 (1 pmol./ µl)	2 µl
Tampon 5×	2 µl
Mix enzyme	1 µl
H ₂ O	1,5 µl
ADN (50 ng)	3 µl

Mix enzyme

Tampon 5×	0,5 µl
AmpliTaqDNA Polymerase, FS	0,7 µl
H ₂ O	2,1 µl

Réactions de séquence

10 sec 96°C	}	15 cycles
5 sec 48°C		
60 sec 70°C	}	15 cycles
10 sec 96°C		
60 sec 70°C		
∞ 4°C		

Ajouter après les réactions de séquence ½ volume de bleu de charge "STOP".
Dénaturer les échantillons 3 minutes à 95°C.

Composition du bleu de charge "STOP".

	Volume/quantité pour 20 ml	Concentrations finales
Formamide	19 ml	95 %
NaOH	8 mg	10 mM
Bleu de Bromophénol	0,02 g	0,10 %
Xylène Cyanol	0,02 g	0,10 %
H ₂ O	1 ml	

Préparation du gel de séquence de 0,2 mm d'épaisseur :

Urée (5M final)	25,2 g
Long Ranger™ 50 %	4,5 ml
TBE 10× "Long Run"	6 ml
QSP	60 ml à l'eau ultra pure

Filtrer l'ensemble sur filtre 0,2 µm
Ajouter 40 µL de Temed et 400 µL d'APS 10%.

Composition du TBE 10× "Long Run" :

Tris :	162 g
Acide Borique :	27,5 g
EDTA Na ₂ ·2H ₂ O	9,3 g
QSP	1 L

Filtrer

Conditions de migration :

Voltage : 3000 V
Intensité : 30 mA
Puissance : 75 W
Température : 45°C
Vitesse de balayage : 3
Ecran : 30×
Tampon de migration : TBE 0,8×

Annexe 13 : Purification des ARNm avec le kit "Quick Messenger RNA" de Talent

Ce protocole est standardisé pour une extraction d'ARNm issus de moins de 700 µg d'ARN totaux.

- Au 300 µl d'ARN totaux , ajouter 200 µl de la solution 1 "IQM-RNA Binding Solution"
- Mélanger bien et ajouter 50 à 150 µl de solution 2 "IQM-RNA Binding Resin", mélanger par pipetage et laisser l'ARN se lier à la résine Oligo-dT pendant 5 minutes à 65°C. Mélanger de temps en temps en renversant le tube
- Laisser le mélange 5 minutes à température ambiante
- Déposer le mélange dans une colonne et centrifuger 1 minute à 12 000 g
- Eliminer le filtrat, resuspendre la résine avec 700 µl de solution 3 "IQM-RNA Washing Solution A" et centrifuger 1 minute à 12 000 g
- Eliminer le filtrat et resuspendre la résine 700 µl de solution 4 "IQM-RNA Washing Solution B" et centrifuger 1 minute à 12 000 g
- Répéter l'étape précédente 2 fois
- Placer la colonne dans un nouveau tube et laver la résine avec 500 µl d'éthanol 75%, centrifuger une minute à 12 000 g
- Placer la colonne dans un nouveau tube et resuspendre la résine avec 30 à 300 µl d'eau traitée au DEPC chauffée à 65°C. Incuber l'ensemble à 65°C sous agitation pendant 5 minutes (Cette étape permet d'éluer environ 90 % des ARNm, une seconde élution
- Centrifuger 1 minute à 12 000 g
- Resuspendre la résine avec 30 à 70 µl d'eau DEPC chauffée à 65°C. Incuber l'ensemble à 65°C pendant 5 minutes sous agitation
- Centrifuger 1 minute à 12 000 g

Annexe 14 : Réalisation des gélules de résine grâce au kit JB-4 Embedding Kit® de Polysciences

Après la déshydratation, les fragments foliaires sont infiltrés dans un mélange d'infiltration composé de Solution A (monomère) et de 1,25 % (P/V) de la poudre C catalytique. La solution d'infiltration doit être mélangée à l'obscurité jusqu'à dissolution complète de la poudre C.

L'infiltration est réalisée à température ambiante une nuit. Les tissus deviennent translucides et coulent au fond du tube.

Les échantillons sont rincés dans le mélange d'infiltration avant la confection des gellules.

Les échantillons sont inclus dans une résine composée de solution d'infiltration (A+C) additionnée de 4 % de solution B polymérisante.

La polymérisation dure 2 heures à température ambiante et sous vide.

Annexes CiSTM

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120
CL13'
CL4'
CL12'
CL6'
cons3'
CiSTME1
CL3 AAAGGTAGGGGCACCACCTGAAGTAGTGGAAAGCTGAGTGGCTGCCATGTCGGGTCGTTCCGGCTCTGGTGGCAGCGGTGGAGGTATGAGCACGAG
CL7'
CL9'
cons5'
CiSTME2P1

130 140 150 160 170 180 190 200 210 220 230 240
CL13'
CL4'
CL12'
CL6'
cons3'
CiSTME1
CL3 CATTGTCGGGCAAGATCCGGCTCTTGATCAGTTTCATGGAAGCTTACTGTGAAATGCTAATTAATAATGAACAAGAACTCTCAAAACCCCTTCAAGGAAGCCATGCTTTTCTGTCAAGGAT
CL7' AAGATCCGGCTCTTGATCAGTTTCATGGAAGCTTACTGTGAAATGCTAATTAATAATGAACAAGAACTCTCAAAACCCCTTCAAGGAAGCCATGCTTTTCTGTCAAGGAT
CL9' GCTCTTGATCAGTTTCATGGAAGCTTACTGTGAAATGCTAATTAATAATGAACAAGAACTCTCAAAACCCCTTCAAGGAAGCCATGCTTTTCTGTCAAGGAT
cons5' GGCTCTTGATCAGTTTCATGGAAGCTTACTGTGAAATGCTAATTAATAATGAACAAGAACTCTCAAAACCCCTTCAAGGAAGCCATGCTTTTCTGTCAAGGAT
CiSTME2P1 AAGATCCGGCTCTTGATCAGTTTCATGGAAGCTTACTGTGAAATGCTAATTAATAATGAACAAGAACTCTCAAAACCCCTTCAAGGAAGCCATGCTTTTCTGTCAAGGAT

250 260 270 280 290 300 310 320 330 340 350 360
CL13'
CL4'
CL12'
CL6'
cons3'
CiSTME1
CL3 CGAGTCACAGTTC AAGGCCATCTCTTTTCTGCCTCGGATTC TGGTGTGGGGATGGAGGCATGGATAGGAACGGGT CATCTGAAGAAGATCTGGATGTGATGTTAATAACAATATGGT
CL7' CGAGTCACAGTTC AAGGCCATCTCTTTTCTGCCTCGGATTC TGGTGTGGGGATGGAGGCATGGATAGGAACGGGT CATCTGAAGAAGATCTGGATGTGATGTTAATAACAATATGGT
CL9' CGAGTCACAGTTC AAGGCCATCTCTTTTCTGCCTCGGATTC TGGTGTGGGGATGGAGGCATGGATAGGAACGGGT CATCTGAAGAAGATCTGGATGTGATGTTAATAACAATATGGT
cons5' CGAGTCACAGTTC AAGGCCATCTCTTTTCTGCCTCGGATTC TGGTGTGGGGATGGAGGCATGGATAGGAACGGGT CATCTGAAGAAGATCTGGATGTGATGTTAATAACAATATGGT
CiSTME2P1 CGAGTCACAGTTC AAGGCCATCTCTTTTCTGCCTCGGATTC TGGTGTGGGGATGGAGGCATGGATAGGAACGGGT CATCTGAAGAAGATCTGGATGTGATGTTAATAACAATATGGT

370 380 390 400 410 420 430 440 450 460 470 480
CL13'
CL4'
CL12'
CL6'
cons3'
CiSTME1
CL3 TGATCCTCAAGCTGAAGAGAGGGAGCTGAAAGGTCAGTTATTGCGCAAGTACAGTGGGTATTTAGGAAGTCTGAAGCAGGAGTTTATGAAGAAGAGAAAAAGGGAAGTTGCCCAAAGA
CL7' TGATCCTCAAGCTGAAGAGAGGGAGCTGAAAGGTCAGTTATTGCGCAAGTACAGTGGGTATTTAGGAAGTCTGAAGCAGGAGTTTATGAAGAAGAGAAAAAGGGAAGTTGCCCAAAGA
CL9' TGATCCTCAAGCTGAAGAGAGGGAGCTGAAAGGTCAGTTATTGCGCAAGTACAGTGGGTATTTAGGAAGTCTGAAGCAGGAGTTTATGAAGAAGAGAAAAAGGGAAGTTGCCCAAAGA
cons5' TGATCCTCAAGCTGAAGAGAGGGAGCTGAAAGGTCAGTTATTGCGCAAGTACAGTGGGTATTTAGGAAGTCTGAAGCAGGAGTTTATGAAGAAGAGAAAAAGGGAAGTTGCCCAAAGA
CiSTME2P1 TGATCCTCAAGCTGAAGAGAGGGAGCTGAAAGGTCAGTTATTGCGCAAGTACAGTGGGTATTTAGGAAGTCTGAAGCAGGAGTTTATGAAGAAGAGAAAAAGGGAAGTTGCCCAAAGA


```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90      100     110     120
CL21  GGCTTCATCTCATCGTCATCATGTTCTTCATCTGTTAAAGCGAAGATCATGTCCTCATCCCCATTACCCCTCGTCTCCATCAGCTTATCTGAATTGCCAAAAGGTAGGGGCACCACCTGAA
CL41  GGCTTCATCTCATCGTCATCATGTTCTTCATCTGTTAAAGCGAAGATCATGTCCTCATCCCCATTACCCCTCGTCTCCATCAGCTTATCTGAATTGCCAAAAGGTAGGGGCACCACCTGAA
CL610 GGCTTCATCTCATCGTCATCATGTTCTTCATCTGTTAAAGCGAAGATCATGTCCTCATCCCCATTACCCCTCGTCTCCATCAGCTTATCTGAATTGCCAAAAGGTAGGGGCACCACCTGAA
CL66  GGCTTCATCTCATCGTCATCATGTTCTTCATCTGTTAAAGCGAAGATCATGTCCTCATCCCCATTACCCCTCGTCTCCATCAGCTTATCTGAATTGCCAAAAGGTAGGGGCACCACCTGAA
CL67  GGCTTCATCTCATCGTCATCATGTTCTTCATCTGTTAAAGCGAAGATCATGTCCTCATCCCCATTACCCCTCGTCTCCATCAGCTTATCTGAATTGCCAAAAGGTAGGGGCACCACCTGAA
CL47  GGCTTCATCTCATCGTCATCATGTTCTTCATCTGTTAAAGCGAAGATCATGTCCTCATCCCCATTACCCCTCGTCTCCATCAGCTTATCTGAATTGCCAAAAGGTAGGGGCACCACCTGAA
CL49  GGCTTCATCTCATCGTCATCATGTTCTTCATCTGTTAAAGCGAAGATCATGTCCTCATCCCCATTACCCCTCGTCTCCATCAGCTTATCTGAATTGCCAAAAGGTAGGGGCACCACCTGAA
CL410 GGCTTCATCTCATCGTCATCATGTTCTTCATCTGTTAAAGCGAAGATCATGTCCTCATCCCCATTACCCCTCGTCTCCATCAGCTTATCTGAATTGCCAAAAGGTAGGGGCACCACCTGAA
CL43  GGCTTCATCTCATCGTCATCATGTTCTTCATCTGTTAAAGCGAAGATCATGTCCTCATCCCCATTACCCCTCGTCTCCATCAGCTTATCTGAATTGCCAAAAGGTAGGGGCACCACCTGAA
CL44  GGCTTCATCTCATCGTCATCATGTTCTTCATCTGTTAAAGCGAAGATCATGTCCTCATCCCCATTACCCCTCGTCTCCATCAGCTTATCTGAATTGCCAAAAGGTAGGGGCACCACCTGAA
CL45  GGCTTCATCTCATCGTCATCATGTTCTTCATCTGTTAAAGCGAAGATCATGTCCTCATCCCCATTACCCCTCGTCTCCATCAGCTTATCTGAATTGCCAAAAGGTAGGGGCACCACCTGAA
CL3 (E2P1) ----- AAAGGTAGGGGCACCACCTGAA
ConsE2P2 GGCTTCATCTCATCGTCATCATGTTCTTCATCTGTTAAAGCGAAGATCATGTCCTCATCCCCATTACCCCTCGTCTCCATCAGCTTATCTGAATTGCCAAAAGGTAGGGGCACCACCTGAA

      130     140     150     160     170     180     190     200     210     220     230     240
CL21  GTAGTGGAAACGACTAGAAGAAGCTTGCCGAGCGTCAGTGATGGCTGCCATGTCCCGTCCGTCCGCTCTGGTGGCAGCGGTGGAGGTATGAGCAGGAGCATTGTCGGACAAGATCCGGCT
CL41  GTAGTGGAAACGACTAGAAGAAGCTTGCCGAGCGTCAGTGATGGCTGCCATGTCCCGTCCGTCCGCTCTGGTGGCAGCGGTGGAGGTATGAGCAGGAGCATTGTC-GACAAGATCC-GCT
CL610 GTAGTGGAAACGACTAGAAGAAGCTTGCCGAGCGTCAGTGATGGCTGCCATGTCCCGTCCGTCCGCTCTGGTGGCAGCGGTGGAGGTATGAGCAGGAGCATTGTCGGACAAGATCCGGCT
CL66  GTAGTGGAAACGACTAGAAGAAGCTTGCCGAGCGTCAGTGATGGCTGCCATGTCCCGTCCGTCCGCTCTGGTGGCAGCGGTGGAGGTATGAGCAGGAGCATTGTCGGACAAGATCCGGCT
CL67  GTAGTGGAAACGACTAGAAGAAGCTTGCCGAGCGTCAGTGATGGCTGCCATGTCCCGTCCGTCCGCTCTGGTGGCAGCGGTGGAGGTATGAGCAGGAGCATTGTCGGACAAGATCCGGCT
CL47  GTAGTGGAAACGACTAGAAGAAGCTTGCCGAGCGTCAGTGATGGCTGCCATGTCCCGTCCGTCCGCTCTGGTGGCAGCGGTGGAGGTATGAGCAGGAGCATTGTC-GACAAGATCC-GCT
CL49  GTAGTGG-ACGACTAGAAGAAGCTTGCCGAGCGTCAGTGATGGCTGCCATGTCCCGTCCGTCCGCTCTGGTGGCAGCGGTGGAGGTATG-GCAGC-GCATTGTCGGGCAAGATCCGGCT
CL410 GTAGTGGAAACGACTAGAAGAAGCTTGCCGAGCGTCAGTGATGGCTGCCATGTCCCGTCCGTCCGCTCTGGTGGCAGCGGTGGAGGTATGAGCAGGAGCATTGTC-GACAAGATCCGGCT
CL43  GTAGTGGAGCGACTAGAAGAAGCTTGCCGAGCGTCAGTGATGGCTGCCATGTCCCGTCCGTCCGCTCTGGTGGCAGCGGTGGAGGTATGAGCAGGAGCATTGTCGGAC-AGACCCGGCT
CL44  GTAGTGGAAACGACTAGAAGAAGCTTGCCGAGCGTCAGTGATGGCTGCCATGTCCCGTCCGTCCGCTCTGGTGGCAGCGGTGGAGGTATGAGCAGGAGCATTGTCGGACAAGATCCGGCT
CL45  GTAGTGA-ACGACTAG-AGAAGCTTGCCGAGCGTCAGTGAT-GGTGCCATGT-CGTCGGTTCGCCCTCTG-----TGCAGCGTGAATATGAGCAGGAGCA-TGTC-GACAAGATC--GCT
CL3 (E2P1) GTAGTGGAAACGACTAGAAGAAGCTTGCCGAGCGTCAGTGATGGCTGCCATGTCCCGTCCGTCCGCTCTGGTGGCAGCGGTGGAGGTATGAGCAGGAGCATTGTCGGACAAGATCCGGCT
ConsE2P2 GTAGTGGAAACGACTAGAAGAAGCTTGCCGAGCGTCAGTGATGGCTGCCATGTCCCGTCCGTCCGCTCTGGTGGCAGCGGTGGAGGTATGAGCAGGAGCATTGTCGGACAAGATCCGGCT

      250     260     270     280     290     300     310     320     330     340     350     360
CL21  CTTGATCAGTTCAT-GAAATCGAATT
CL41  CTTGATCAG-TCAT-GAAATCGAATT
CL610 CTTGATCAGTTCATGGAAATCG-----
CL66  CTTGATCAGTTCATGGAAATCG-----
CL67  CTTGATCAGTTCATGGAAATCG-----
CL47  CTTGATCAGTTCATG-A-----
CL49  CTTGATC-GTTCATGG---TCG-----
CL410 CTTGATCAGTTCATGGAAATCG-----
CL43  CTTGATCAG-TCAT-GAAATCG-----
CL44  CTTGATCAGTTCATG-AATTCG-----
CL45  C-TCATCAGTTCATG--AATCG-----
CL3 (E2P1) CTTGATCAGTTCATGGAAATCGTGTGAAATGCTAAATAAATATGAACAAGAACTCTCAAACCCCTTCAAGGAAGCCATGCTTTTTCTGTCAAGGATCGAGTACAGTTCAAGGCCATC
ConsE2P2 CTTGATCAGTTCATGGAAATCG-----

```

Annexe 16: Alignement des clones obtenus après la seconde PCR inverse et établissement de la séquence consensus E2P2.

Annexes CiCLV1p


```

        610      620      630      640      650      660      670      680      690      700      710      720
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CL1  CGGTTGACGGTTGATGGAAAACTAATTACTGCTGGACGGATTTACTGAAATGTTAAACATAATGGAGTTCGTTGCTAGAAGGTCGATGAATCCATCCCTCATGTAGTTTATTTTGTGTA
CL2  CGGTTGACGGTTGATGGAAAACTAATTACTGCTGGACGGATTTACTGAAATGTTAAACATAATGGAGTTCGTTGCTAGAAGGTCGATGAATCCATCCCTCATGTAGTTTATTTTGTGTA
CL5  CGGTTGACGGTTGATGGAAAACTAATTACTGCTGGACGGATTTACTGAAATGTTAAACATAATGGAGTTCGTTGCTAGAAGGTCGATGAATCCATCCCTCATGTAGTTTATTTTGTGTA
CL6  CGGTTGACGGTTGATGGAAAACTAATTACTGCTGGACGGATTTACTGAAATGTTAAACATAATGGAGTTCGTTGCTAGAAGGTCGATGAATCCATCCCTCATGTAGTTTATTTTGTGTA
CL7  CGGTTGACGGTTGATGGAAAACTAATTACTGCTGGACGGATTTACTGAAATGTTAAACATAATGGAGTTCGTTGCTAGAAGGTCGATGAATCCATCCCTCATGTAGTTTATTTTGTGTA
CL8  CGGTTGACGGTTGATGGAAAACTAATTACTGCTGGACGGATTTACTGAAATGTTAAACATAATGGAGTTCGTTGCTAGAAGGTCGATGAATCCATCCCTCATGTAGTTTATTTTGTGTA
consE2 CGGTTGACGGTTGATGGAAAACTAATTACTGCTGGACGGATTTACTGAAATGTTAAACATAATGGAGTTCGTTGCTAGAAGGTCGATGAATCCATCCCTCATGTAGTTTATTTTGTGTA

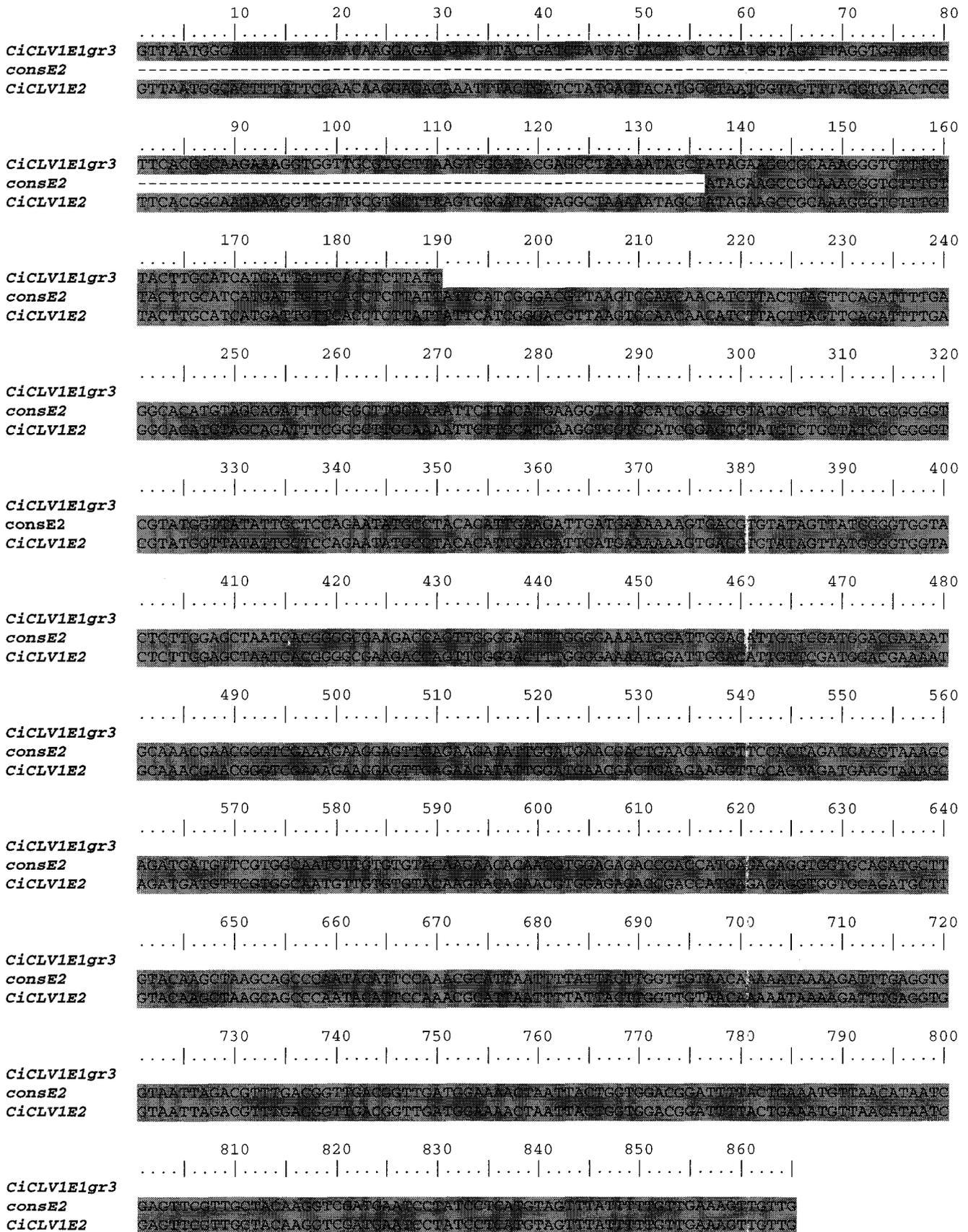
```

```

              730
.....|.....|.....|.
CL1  AAGTTGTTGTTTT
CL2  AAGTTGTTGTT
CL5  AAGTTGTTG
CL6  AAGTTGTTGTTTTTGG
CL7  AAGTTGTTGTTTT
CL8  GAGTTGTTGTTTTT
consE2 AAGTTGTTG

```

Annexe 19 : Alignement des séquences obtenues après l'étape 2 et déduction de la séquence *cons E2*.



Annexe 20 : Alignement de la séquence consensus *consE2* et de la séquence consensus *CiCLV1gr3* et déduction de la séquence consensus *CiCLV1E2*.

	10	20	30	40	50	60	70	80	90
CL3	AGATGAGAAACCACCAATTCTAAATCAACCTGGAAGCTCACCGCATCTCAAAAAC TAGAGTTTGGGAGCCAGATAATCTCGAATGCTTGA								
CL4	AGATGAGAAACCACCAATTCTAAATCAACCTGGAAGCTCACCGCATCTCAAAAAC TAGAGTTTGGGAGCCAGATAATCTCGAATGCTTGA								
ConsE3P1	AGATGAGAAACCACCAATTCTAAATCAACCTGGAAGCTCACCGCATCTCAAAAAC TAGAGTTTGGGAGCCAGATAATCTCGAATGCTTGA								
	100	110	120	130	140	150	160	170	180
CL3	AAGACAATAACATTATCGGGCAAGGTTGTCAGGTGTTGTTTATGGCGGAACAATGCCAATCCGAGAGCAAGGAGCAATCAAGACCTGG								
CL4	AAGACAATAACATTATCGGGCAAGGTTGTCAGGTGTTGTTTATGGCGGAACAATGCCAATCCGAGAGCAAGTACCAATCAAGACCTGG								
ConsE3P1	AAGACAATAACATTATCGGGCAAGGTTGTCAGGTGTTGTTTATGGCGGAACAATGCCAATCCGAGAGCAAGKAGCAATCAAGACCTGG								
	190	200	210	220	230	240	250	260	270
CL3	AAGACAATAACATTATCGGGCAAGGTTGTCAGGTGTTGTTTATGGCGGAACAATGCCAATCCGAGAGCAAGTACCAATCAAGACCTGG								
CL4	AAGACAATAACATTATCGGGCAAGGTTGTCAGGTGTTGTTTATGGCGGAACAATGCCAATCCGAGAGCAAGTACCAATCAAGACCTGG								
ConsE3P1	AAGACAATAACATTATCGGGCAAGGTTGTCAGGTGTTGTTTATGGCGGAACAATGCCAATCCGAGAGCAAGTACCAATCAAGACCTGG								
	280	290	300	310	320	330	340	350	360
CL3	GGTTAATGCCACTTTGTTTCAACAAGGAGACAAATTTACTGATCTATGAGTAGATGGCTAATGGTACTTATAGGTAAGTCCCTTCACGGCA								
CL4	GGTTAATGCCACTTTGTTTCAACAAGGAGACAAATTTACTGATCTATGAGTAGATGGCTAATGGTACTTATAGGTAAGTCCCTTCACGGCA								
ConsE3P1	GGTTAATGCCACTTTGTTTCAACAAGGAGACAAATTTACTGATCTATGAGTAGATGGCTAATGGTACTTATAGGTAAGTCCCTTCACGGCA								
	370	380							
CL3	AGAAAGCTGGTTCCCTCCCTTAAGTGGGAT								
CL4	AGAAAGCTGGTTCCCTCCCTTAAGTGGGAT								
ConsE3P1	AGAAAGCTGGTTCCCTCCCTTAAGTGGGAT								

Annexe 21 : Alignement des clones issus de l'amplification de l'étape 3 phase1 et déduction de la séquence consensus *E3P1*

10 20 30 40 50 60 70 80

CiCLV1E3P1
E3P2
CiCLV1p
TGACATCGACTGCAATATGAGTACAAACAATTTCCCGTGGAAATCCGCCCCAGATTTTCATYTTTTCGTCGGTCACTTA
TGACATCGACTGCAATATGAGTACAAACAATTTCCCGTGGAAATCCGCCCCAGATTTTCGAVTGTTCGTCGGTCACTTA

90 100 110 120 130 140 150 160

CiCLV1E3P1
E3P2
CiCLV1p
CTTGGACCTCAGGCGAAACCAACTGCACAGTCCGAATCCCTCCTGAAATATCAAACTCCGATACTGAAATTAATCAATG
CTTGGACCTCAGGCGAAACCAACTGCACAGTCCGAATCCCTCCTGAAATATCAAACTCCGATACTGAAATTAATCAATG

170 180 190 200 210 220 230 240

CiCLV1E3P1
E3P2
CiCLV1p
TGTCAATCGAACCACTTAAAGAAACCCFACCTGACCAATTCGGTTCCATGAAAGCCCTACATCCGCAGATTTCTCCAC
TGTCAATCGAACCACTTAAAGAAACCCFACCTGACCAATTCGGTTCCATGAAAGCCCTACATCCGCAGATTTCTCCAC

250 260 270 280 290 300 310 320

CiCLV1E3P1
E3P2
CiCLV1p
AACAATTATCCGGTTCATTCCTGAGAGCGCCAGTACACCCTCATGAGCCCATCTCTCTTTTCGGGCAACCGTAACT
AACAATTATCCGGTTCATTCCTGAGAGCGCCAGTACACCCTCATGAGCCCATCTCTCTTTTCGGGCAACCGTAACT

330 340 350 360 370 380 390 400

CiCLV1E3P1
E3P2
CiCLV1p
CTGTGCACCTTTCTGCAACCACACCGTGCACAACTGCTTCCCATTCCTTCACAAAACAACRATCAAGTTGATAAACA
CTGTGCACCTTTCTGCAACCACACCGTGCACAACTGCTTCCCATTCCTTCACAAAACAACRATCAAGTTGATAAACA

410 420 430 440 450 460 470 480

CiCLV1E3P1
E3P2
CiCLV1p
AAGCCGCAAGGTTCCCGGAAAGCAAGCTTAAATTCGCTTCGGACTTTAGTTTATTCCTCCGTCGGATTCGTCATATTA
AAGCCGCAAGGTTCCCGGAAAGCAAGCTTAAATTCGCTTCGGACTTTAGTTTATTCCTCCGTCGGATTCGTCATATTA

490 500 510 520 530 540 550 560

CiCLV1E3P1
E3P2
CiCLV1p
GCATGAGAACCAACCTTCTAATTAACCTGGAGCTGATTCGCATVTCAAAACCTAGAGTT
GCAGTTATCAAGACTAGAAAGATGAGAACCAGCAATTCATAATCAACCTGGAACCTCAGCGGAINTCAAAACCTAGAGTT
GCAGTTATCAAGACTAGAAAGATGAGAACCAGCAATTCATAATCAACCTGGAAGCTCAGCGCATVTCAAAACCTAGAGTT

570 580 590 600 610 620 630 640

CiCLV1E3P1
E3P2
CiCLV1p
TGGGAGCCAAAGATATTCCTCGAATTCCTTGAAGACCAAAACATTAATTCGGCAAGCTGCTTLAGGTTCTTTTNTGGGGAA
TGGGAGCCAAAGATATTCCTCGAATTCCTTGAAGACCAAAACATTAATTCGGCAAGCTGCTTLAGGTTCTTTTNTGGGGAA
TGGGAGCCAAAGATATTCCTCGAATTCCTTGAAGACCAAAACATTAATTCGGCAAGCTGCTTLAGGTTCTTTTNTGGGGAA

650 660 670 680 690 700 710 720

CiCLV1E3P1
E3P2
CiCLV1p
AAATGGCAAAACGGAGAGCAATKAGCAATCAAGAGCTGGAAACAAGCAATGCAATGGAGTTGCAACGACTGCTGGCCTG
AAATGGCAAAACGGAGAGCAATKAGCAATCAAGAGCTGGAAACAAGCAATGCAATGGAGTTGCAACGACTGCTGGCCTG
AAATGGCAAAACGGAGAGCAATKAGCAATCAAGAGCTGGAAACAAGCAATGCAATGGAGTTGCAACGACTGCTGGCCTG

730 740 750 760 770 780 790 800

CiCLV1E3P1
E3P2
CiCLV1p
TCTGCAGAGATACAGCACTGGCAAGCATACGACATCAATATACTCAGCTTAATGGCACTTTGTTTGAACAGGACAC
TCTGCAGAGATACAGCACTGGCAAGCATACGACATCAATATACTCAGCTTAATGGCACTTTGTTTGAACAGGACAC
TCTGCAGAGATACAGCACTGGCAAGCATACGACATCAATATACTCAGCTTAATGGCACTTTGTTTGAACAGGACAC

810 820 830 840 850 860 870 880

CiCLV1E3
E3P2
CiCLV1p
AAATTTACTGATCAATGACATGCTGCTATGCTAGCTTAGGTTGACTTCCTTCACGGCAAGAAAGGTTGGTTCCCTGCTTA
AAATTTACTGATCAATGACATGCTGCTATGCTAGCTTAGGTTGACTTCCTTCACGGCAAGAAAGGTTGGTTCCCTGCTTA
AAATTTACTGATCAATGACATGCTGCTATGCTAGCTTAGGTTGACTTCCTTCACGGCAAGAAAGGTTGGTTCCCTGCTTA

```

      890      900      910      920      930      940      950      960
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CiCLV1E3P1  ATGTCGATACGAGGCTAAATAATAGCTATAGAACCCCGCAAGGGCTTTGGTAAATGCAATATGATTGTTCCACCTTTATTT
E3P2          AGTGGCA
CiCLV1p     AGTGGGATACGAGGCTAAATAATAGCTATAGAAAGCCGAAAGGCTTTCTTTACTTTCATCATGATTTGTTCCACCTTCTTATTT

      970      980      990      1000     1010     1020     1030     1040
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CiCLV1E3P1  ATTTCATCGGGACCTTAACTTCCAAACAACATCTTACTTAGTTTCAGATTTTCAGCCACAATGTATCCACATTTCCGGCTTGCAAA
E3P2          ATTTCATCGGGACCTTAACTTCCAAACAACATCTTACTTAGTTTCAGATTTTCAGCCACAATGTATCCACATTTCCGGCTTGCAAA
CiCLV1p     ATTTCATCGGGACCTTAACTTCCAAACAACATCTTACTTAGTTTCAGATTTTCAGCCACAATGTATCCACATTTCCGGCTTGCAAA

      1050     1060     1070     1080     1090     1100     1110     1120
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CiCLV1E3P1  ATTCTTGCATCAAGCTGGTTCGCTGGGACTGTATGCTGCTATTCGGCGGGCTCGTAAAGGTTATATGCTCCAGAATATGGCT
E3P2          ATTCTTGCATCAAGCTGGTTCGCTGGGACTGTATGCTGCTATTCGGCGGGCTCGTAAAGGTTATATGCTCCAGAATATGGCT
CiCLV1p     ATTCTTGCATCAAGCTGGTTCGCTGGGACTGTATGCTGCTATTCGGCGGGCTCGTAAAGGTTATATGCTCCAGAATATGGCT

      1130     1140     1150     1160     1170     1180     1190     1200
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CiCLV1E3P1  ACACATAGAAAGATTTGATGAAAAAAGTACCGTCTAATAGTTATGGGGTGGTACTCTTTGGAGCTAAATCACGGGGCGAAGACAA
E3P2          ACACATAGAAAGATTTGATGAAAAAAGTACCGTCTAATAGTTATGGGGTGGTACTCTTTGGAGCTAAATCACGGGGCGAAGACAA
CiCLV1p     ACACATAGAAAGATTTGATGAAAAAAGTACCGTCTAATAGTTATGGGGTGGTACTCTTTGGAGCTAAATCACGGGGCGAAGACAA

      1210     1220     1230     1240     1250     1260     1270     1280
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CiCLV1E3P1  GTTGGGGACTTTGGGAAAAATCGATTCGACATTCCTTCGATGGACGAAAAATGCAAACGAAACGGTTCGAAAGAAGGACTTGA
E3P2          GTTGGGGACTTTGGGAAAAATCGATTCGACATTCCTTCGATGGACGAAAAATGCAAACGAAACGGTTCGAAAGAAGGACTTGA
CiCLV1p     GTTGGGGACTTTGGGAAAAATCGATTCGACATTCCTTCGATGGACGAAAAATGCAAACGAAACGGTTCGAAAGAAGGACTTGA

      1290     1300     1310     1320     1330     1340     1350     1360
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CiCLV1E3P1  GAAGCAATTTGGATGAACGACCTAAGACGGTTGACCTTGAATGAAGTAAACCAATGATGCTTCTCCCAATGTTGTGTGTAG
E3P2          GAAGCAATTTGGATGAACGACCTAAGACGGTTGACCTTGAATGAAGTAAACCAATGATGCTTCTCCCAATGTTGTGTGTAG
CiCLV1p     GAAGCAATTTGGATGAACGACCTAAGACGGTTGACCTTGAATGAAGTAAACCAATGATGCTTCTCCCAATGTTGTGTGTAG

      1370     1380     1390     1400     1410     1420     1430     1440
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CiCLV1E3P1  AAGAAACAACCGTGGAGAGACCGACCATGAAAGAGTGGTCCAGATGCTTGTACAAAGCTAAGCAGCCCAATACATTCCAA
E3P2          AAGAAACAACCGTGGAGAGACCGACCATGAAAGAGTGGTCCAGATGCTTGTACAAAGCTAAGCAGCCCAATACATTCCAA
CiCLV1p     AAGAAACAACCGTGGAGAGACCGACCATGAAAGAGTGGTCCAGATGCTTGTACAAAGCTAAGCAGCCCAATACATTCCAA

      1450     1460     1470     1480     1490     1500     1510     1520
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CiCLV1E3P1  ACCGATTAATTTTATTACTTGGTTGTAACAATAATAAAGATTTAGGCTCGDAATTAGAAGCTTTCACCGTTCACCGGTTGA
E3P2          ACCGATTAATTTTATTACTTGGTTGTAACAATAATAAAGATTTAGGCTCGDAATTAGAAGCTTTCACCGTTCACCGGTTGA
CiCLV1p     ACCGATTAATTTTATTACTTGGTTGTAACAATAATAAAGATTTAGGCTCGDAATTAGAAGCTTTCACCGTTCACCGGTTGA

      1530     1540     1550     1560     1570     1580     1590     1600
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CiCLV1E3P1  TGGAAAACAAATTACTGGTCCGACCGATTTACTTGAATGCTAACATAATCCAGCTTCGCTTCCACAAGGCTCCGATGAAATCC
E3P2          TGGAAAACAAATTACTGGTCCGACCGATTTACTTGAATGCTAACATAATCCAGCTTCGCTTCCACAAGGCTCCGATGAAATCC
CiCLV1p     TGGAAAACAAATTACTGGTCCGACCGATTTACTTGAATGCTAACATAATCCAGCTTCGCTTCCACAAGGCTCCGATGAAATCC

      1610     1620     1630
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CiCLV1E3P1  ATGCTCAATGATTTATTTTCTTGAAGCTTCGTTG
E3P2          ATGCTCAATGATTTATTTTCTTGAAGCTTCGTTG
CiCLV1p     ATGCTCAATGATTTATTTTCTTGAAGCTTCGTTG

```

Annexe 24 : Alignement des séquences consensus *CiCLV1E3P1* et *E3P2* et déduction de la séquence consensus *CiCLV1p*.

Annexe 25 : Noms et numéros d'accension des séquences représentant les différentes sous-familles de RLK utilisées pour l'analyse phylogénétique de la figure 54.

At1g67720 PlantsP Protein:83372 putative LRR receptor-like kinase (PPC:1.8.1)-**LRR-I**
At4g30520 PlantsP Protein:83641 putative LRR receptor-like protein kinase (PPC:1.12.2)-**LRR-II**
g3015486 PlantsP Protein:82693 receptor like protein kinase (PPC:1.13.4)tomate-**LRRIII**
At5g24100 PlantsP Protein:84299 receptor like protein kinase (PPC:1.13.3)**LRRIII**
At2g45340 PlantsP Protein:83881 putative receptor like protein kinase (PPC:1.13.2)-**LRR-IV**
SRF6 PlantsP Protein:136040 SRF6 (PPC:1.1.1)-**LRR-V**
At2g02780 PlantsP Protein:83915 putative receptor like protein kinase (PPC:1.15.2)-**LRR-VI**
At1g66830 PlantsP Protein:83478 hypothetical protein (PPC:1.13.1)- **LRR-VII**
At5g01950 PlantsP Protein:83647 putative protein receptor protein kinases (PPC:1.3.2)-**LRR-VIII.1**
At2g31880 PlantsP Protein:83864 putative receptor like protein kinase (PPC:1.12.5)-**LRR-X**
At1g27190 PlantsP Protein:83355 putative LRR receptor-like kinase (PPC:1.12.1)-**LRR-X**
At4g20270 PlantsP Protein:83634 CLV1 receptor kinase like protein CLAVATA1 (PPC:1.12.4)-**LRRXI**
At5g46330 PlantsP Protein:84324 receptor protein kinase (PPC:1.12.4)(LS2)-**LRRXII**
At3g21630 PlantsP Protein:84018 putative protein kinase (PPC:1.1.3)-**LysM**
At1g07570 PlantsP Protein:83737 protein kinase APK1A (PPC:1.2.2)-**RLCK**
At2g39180 PlantsP Protein:83956 putative protein kinase (PPC:1.4.1)-**Crinkly-like**
WAK4 PlantsP Protein:83832 Wall-Associated Kinase 4 (PPC:1.5.1)-**WAK**
PERK9 PlantsP Protein:83731 Proline Extensin-like Receptor Kinase 9 (PPC:1.6.2)-**PERK-like**
At1g11050 PlantsP Protein:83796 Ser/Thr protein kinase isolog (PPC:1.6.4)-**RKF3-like**
At4g21380 PlantsP Protein:84160 receptor like ser/thr protein kinase ARK3 (PPC:1.7.2)-DUF26At5g38260 PlantsP Protein:83675 receptor ser/thr protein kinase like receptor (PPC:1.9.1)-**PR5K-Thaumat**
At5g60900 PlantsP Protein:83711 S-receptor kinase homolog 2 precursor S-receptor (PPC:1.9.2)-**S-domain**
At1g70130 PlantsP Protein:83768 Lectin domain receptor-like protein kinase (PPC:1.11.1)-**Lectin**
At5g38260 PlantsP Protein:83675 receptor ser/thr protein kinase like receptor (PPC:1.9.1)-**PR5K-Thaumat**

Annexe 26

Séquence nucléotidique partielle d'ADN *18S* de tournesol (N° Acc AF107577) et position des amorces utilisées pour les amplifications par RT PCR en temps réel. La séquence de tournesol a été choisie en raison de la proximité botanique du tournesol et de la chicorée (Astéracées). La définition des amorces (figurées par des flèches) résulte d'un alignement préalable de plusieurs séquences partielles d'ADN *18S* de plantes.

```

TCATATGCTTGTCTCAAAGATTAAGCCATGCATGTGTAAGTATGAACAAATTCAGACTGTGAAACTGCGA
ATGGCTCATTAAATCAGTTATAGTTTGTGTTGATGGTATCTTGTACTCGGATAACCGTAGTAATTCTAGA
GCTAATACGTGCAACAAACCCCGACTTCTGGAAGGGATGCATTTATTAGATAAAAAGGTCGACGCGGGCTT
TGCCCGTTGCTGCGATGATTCATGATAACTCGACGGATCGCACGGCCCTTGTGCCGGCGACGCATCATT
AAATTTCTGCCCTATCAACTTTCGATGGTAGGATAGTGGCCTACTATGGTGGTGACGGGTGACCGGAGAAT
TAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCCGCGAAA
TTACCCAATCCTGACACGGGGAGGTAGTGACAATAAATAACAATAACGGGCTCATACGTCTGGTAATT
GGAATGAGTACAATCTAAATCCCTTAACGAGGATCCATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGT
AATTCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAGTTGTGTCAGTTAAAAGCTCGTAGTTGGACTTTGGGTTGGG
TCGGCCGGTCCGCCATCAGGTGTGCACCGGTTTACTCGTCCCTTCTGTCCGGCGATGCGCTCCTACCCTTA
ACTGGGCGGGTCTGCCTCCGGCGTGTACTTTGAAGAAATAGAGTGCCTAAAGCAAGCCTACGCTCT
GTATACATTAGCATGGGATAACATCATAGGATTCGGTCCCTATTACGTTGGCCTTCGGGATCGGAGTAAT
GATTAACAGGGACAGTCGGGGGCATTCGTATTTTCATAGTCAGAGGTGAAATCTTTGGATTATGAAAGAC
GAACAACTGCGAAAGCATTTGCCAAGGATGTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTGGGGCTCGAAGACG
ATCAGATACCGTCTTAGTCTCAACCATAAACGATGCCGACCAGGGATCAGCGGATGTTGCTTTTAGGACT
CCGCTGGCACCTTATGAGAAATCAAAGTTTGGGTTCCGGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTA
AAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGAGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGGAAACTT
ACCAGGTCCAGACATAGTAAGGATTGACAGACTGAGAGCTCTTCTTGATTCTATGGGTGGTGGTGCATG
GCCGTTCTTAGTTGGTGGAGCGATTGTCTGGTTAATTCCGTTAACGAACGAGACCTCAGCCTGCTAACT
AGCTATGTGGAGGTATCCCTCCATGGCCAGCTTCTTAGAGGGACTATGGCCTTTTAGGCCACGGAAGTTT
GAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCCGCACGCGCGCTACACTGATGTATTCAAC
GAGTATATAGCCTTGGCCGACAGGCCCGGAAATCTTTGAAATTTTCATCGTGATGGGGATAGATCATTGC
AATTTGTTGGTCTTAAACGAGGAATTCCTAGTAAGCGCGAGTCATCAGCTCGCGTTGACIACGTCCTGCC
CTTTGTACACACCGCCCGTGCCTCCTACCGATTGAATGGTCCGGTGAAGTGTTAGGATCGTGGCGACRTG
GGCGGTTCCGTGCCCCGCGACGTCCGCGAGAATCCACTGAACCTTATCATTAGAGGAAGGAGATCG
  
```

Annexe 27

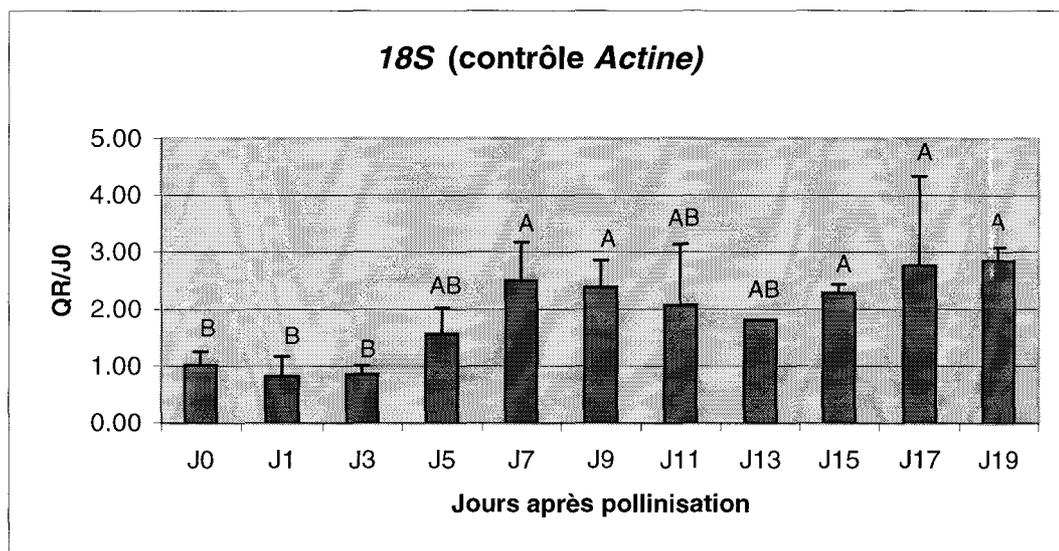
Séquence nucléotidique partielle de l'ADNc du gène d'*actine* utilisé comme référence pour les expériences de RT PCR en temps réel. Les amorces utilisées sont figurées par des flèches.

```

CiAct  ATTCTCCGTCTCGACCTCGCTGGCCGTGACCTCACCGACTCCCTAATGAAATCCTAACC
CiAct  GAAAGAGGTTACATGTTACCACCACAGCCGAACGGGAAATTGTCCGTGACATGAAAGAG
CiAct  AAACTCGCCTACGTGGCACTCGACTTCGAACAAGAGCTTCGAAACCGCCAAATCCAGCTCA
CiAct  TCAGTCGAAAAGAACTACGAATTACCCGACGGACAGGTCATCACCATTGGAGCCGAAAGA
CiAct  TTCCGGTCCCCGGAGGTCCTCTTCCAGCCGTCTCTCATCGGAATGGAAGCTGCCGGAATT
CiAct  CACGAGACTACTTATAACTCCATCATGAAGTGTGACGTTGATATCAGGAAGGATCTTTAC
CiAct  GGGAACATTGTTCTTAGTGGTGGT
  
```

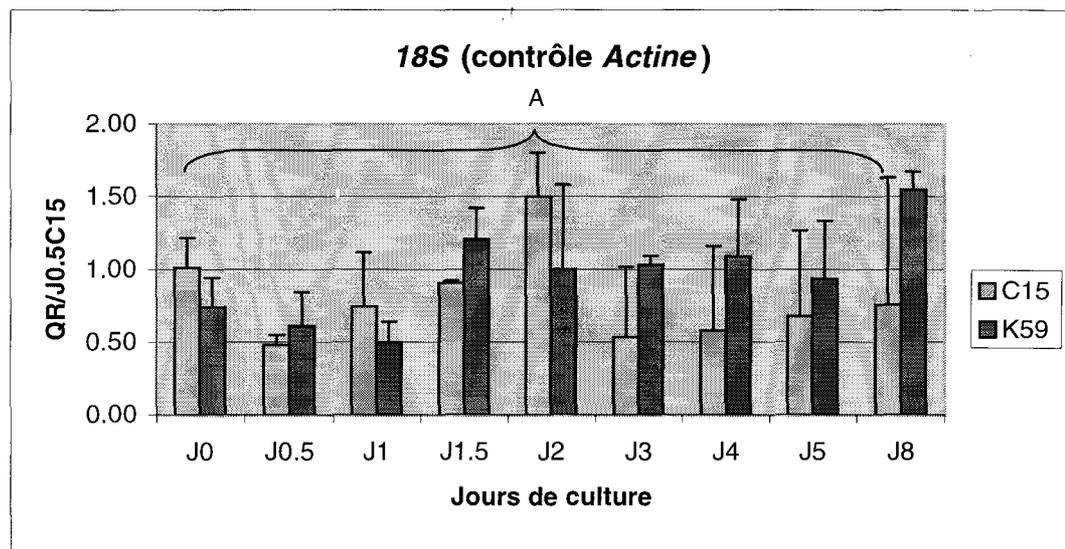
Annexe 28 :

Evolution de la quantité relative des transcrits *18S* au cours de l'embryogenèse zygotique de la chicorée. Le gène contrôle utilisé est l'*Actine*



Annexe 29 :

Evolution de la quantité relative des transcrits *18S* au cours de l'embryogenèse somatique de la chicorée. Le gène contrôle utilisé est l'*Actine*



Les différences significatives de QR ont été calculées par rapport au J0 avec le test de Student-Newman-Keuls. Chaque jour ayant une lettre différente de celle du J0 est significativement différent de ce dernier au seuil de 5%. Les barres d'erreur représentent les écarts types

