

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

RECHERCHE DE GÈNES ASSOCIÉS À LA TOLÉRANCE À
L'ALUMINIUM CHEZ LE BLÉ *Triticum aestivum*
ET LE RIZ *Oryza sativa* PAR DE NOUVELLES APPROCHES
MOLÉCULAIRES

THÈSE
PRÉSENTÉE
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DU DOCTORAT EN BIOLOGIE

PAR
FRANCK TARENDEAU

JUILLET 2007

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

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

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier le Professeur Eric Rassart pour m'avoir permis de mener à bien mon Doctorat en Biologie au sein de l'Université du Québec à Montréal.

Les travaux de cette thèse ont été réalisés dans le laboratoire du Professeur Mario Houde, UQAM.

Je remercie le Professeur Normand Chevrier pour les semis et récoltes des variétés génétiques de blé.

Je tiens à témoigner ma reconnaissance aux centres TOXEN et CIRTOX pour les bourses d'excellence qu'ils m'ont attribuées.

Je suis aussi redevable envers les équipes des professeurs Normand Chevrier et Fathey Sarhan qui m'ont toujours apporté leur aide et en particulier à Ghislain Breton, Jean-Benoît Frenette-Charron, N'Djido Kane, France et Jean Danyluk.

Je tiens aussi à remercier les stagiaires qui ont participé à mon projet : Jeanne-Françoise Bwanakeye, Nicolas Besnier et François Binet. Mais j'accorde une importance toute particulière à ma collaboratrice Josée Demers pour notre projet commun.

Plus spécialement, je remercie très chaleureusement mes amis et collègues de laboratoire : Marie Champoux, Josée Demers, Kim Maltais et Nicolas Besnier. Ces quatre années ont été mémorables et vous y êtes pour beaucoup.

Je suis aussi reconnaissant envers Emmanuelle Guilhon pour son soutien.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES	vii
LISTE DES TABLEAUX.....	xii
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES	xiv
LISTE DES SYMBOLES.....	xvi
RÉSUMÉ.....	xvii
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE I	
ÉTAT DES CONNAISSANCES.....	4
1.1. Mécanismes moléculaires de l'homéostasie et de la tolérance aux métaux lourds chez les plantes.....	4
1.1.1. L'absorption des ions métalliques	6
1.1.2. La séquestration des ions métalliques : mécanisme de la tolérance au zinc et cadmium.....	9
1.1.3. La chélation des ions métalliques : mécanisme de la tolérance au cuivre, au nickel et à l'aluminium	11
1.2. La phytotoxicité de l'aluminium.....	13
1.2.1. Les sols acides : lieux naturels de la toxicité à l'aluminium	14
1.2.2. L'apex racinaire : cible initiale de l'aluminium	16
1.2.3. Localisation cellulaire de l'aluminium.....	19
1.2.4. Dérégulation du potentiel membranaire.....	19
1.2.5. Les voies de signalisation	21
1.2.6. L'ADN.....	21
1.2.7. Le stress oxydatif	22

1.2.8. Gènes induits par l'aluminium.....	24
1.3. La tolérance à l'aluminium	26
1.3.1. Expression de la tolérance.....	26
1.3.2. Le support génétique de la tolérance.....	28
1.3.3. Gènes et protéines de tolérance.....	30
1.3.4. La sécrétion d'acides organiques : mécanisme de tolérance à l'aluminium spécifique du blé	32
1.3.5. Les hyperaccumulateurs d'aluminium.....	39
 CHAPITRE II	
MATÉRIELS ET MÉTHODES	42
2.1. Matériel végétal.....	42
2.2. Matériel microbiologique	43
2.3. Extraction d'ARN et traitement à la DNase RQ1	45
2.4. Quantification des ARN	47
2.5. Hybridation Soustractive Suppressive.....	47
2.5.1. Chromatographie d'ARN poly A ⁺	51
2.5.2. Driver et tester.....	52
2.5.3. Les différents protocoles.....	53
2.5.4. Synthèse du premier brin d'ADNc.....	55
2.5.5. Synthèse du deuxième brin d'ADNc	56
2.5.6. Traitements des ADNc double-brin	57
2.5.7. Ligation des adaptateurs aux fragments d'ADNc tester digérés.....	58
2.5.8. Première hybridation tester/driver pour chaque série d'adaptateur	59
2.5.9. Mélange des testers et deuxième hybridation contre le driver.....	59
2.5.10. Remplissage des extrémités 3' et amplification PCR.....	60
2.5.11. Amplification PCR nichée	61
2.5.12. Criblage des banques SSH	63
2.5.13. Comparaisons des Banques SSH	64

2.6. RT-PCR des gènes 49E8 et 49A1	65
2.7. PCR en temps réel du gène 49A1.....	66
2.8. Banques d'expression de protéines Gateway.....	67
2.8.1. Modulation du système GeneRacer d'INVITROGEN.....	68
2.8.2. Le système GATEWAY d'INVITROGEN.....	71
2.8.3. Transformation et expression dans la levure.....	76
2.8.4. Extractions d'ADN plasmidique chez la levure.....	78
 CHAPITRE III	
RÉSULTATS	79
3.1. Inhibition de croissance racinaire due à l'aluminium chez différentes lignées de blé	79
3.2. Banques SSH.....	88
3.2.1. Banques SSH 1 et 2.....	88
3.2.2. Banques SSH 3, 4 et 5.....	95
3.2.3. Analyse des nouveaux procédés de Suppression PCR appliqués à la SSH103	
3.3. 49A1, gène de tolérance?	109
3.3.1. Expression différentielle du gène 49A1.....	109
3.3.2. Recherche de la séquence entière du gène et de la protéine 49A1 de blé123	
3.3.3. Prédictions des régions transmembranaires et du rôle potentiel du promoteur du gène 49A1.....	129
3.3.4. Potentiel de tolérance du gène 49A1 de blé.....	134
3.4. Banques de protéines Gateway.....	136
3.4.1. Première Stratégie : insertion des séquences AttB1 et AttB2 par GeneRacer.....	137
3.4.2. Deuxième stratégie : utilisation d'un vecteur Gateway ouvert par des topoisomérases.	138
3.4.3. Troisième stratégie : insertion des séquences AttB1 et Attb2 en deux temps	139

CHAPITRE IV

DISCUSSION	145
4.1. Le gène 49A1	145
4.1.1. Dérégulation du gène 49A1	145
4.1.2. La protéine 49A1	148
4.1.3. Le gène ALTM1.....	152
4.1.4. Mécanismes hypothétiques de transports impliqués dans la tolérance à l'aluminium.....	159
4.2. L'Hybridation Suppressive Soustractive (SSH)	161
4.3. Les banques Gateway	175
4.4. Perspectives	178
4.4.1. Le gène 49A1 : tolérance et phytoremédiation	178
4.4.2. Famille de transporteurs.....	180
4.4.3. Autres gènes	180
4.4.4. Validation des améliorations techniques.....	181
4.5. Conclusion.....	182
APPENDICE A RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES	185
APPENDICE B DÉCLARATION D'INVENTION.....	206
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	239

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 : Schéma hypothétique simplifié de l'homéostasie cellulaire des métaux chez les plantes.....	5
Figure 1.2 : Transporteurs de métaux identifiés chez les plantes.	8
Figure 1.3 : Répartition des sols acides à travers le monde.	15
Figure 1.4 : Effet de l'aluminium sur la croissance des racines et sur la structure des apex racinaires.....	16
Figure 1.5: Les différentes régions de l'apex racinaire de maïs (<i>Zea mays</i> L. cv Lixis)	17
Figure 1.6 : Cinétique d'inhibition par l'ion Al^{3+} de la croissance relative des racines chez le maïs.	27
Figure 1.7 : Modèles de la sécrétion d'anions d'acides organiques stimulée par l'aluminium dans les racines de plantes.	33
Figure 1.8 : Les enzymes impliquées dans le métabolisme du citrate et du malate....	36
Figure 1.9 : Quantité d'acide organique sécrétée par différentes luzernes transgéniques.....	37
Figure 1.10 : Influence de l'aluminium sur l'élongation racinaire de différentes luzernes transgéniques.	38
Figure 1.11 : Transport et distribution de l'aluminium chez le sarrasin.....	40
Figure 2.1 : Carte des plasmides pGEM [®] -T et pGEM [®] -T easy de PROMEGA.	44
Figure 2.2 : Schéma du protocole de SSH décrit par Diatchenko <i>et al.</i> (1996).	50
Figure 2.3 : Variation de protocoles entre les cinq banques SSH.....	55
Figure 2.4 : Principe du système GeneRacer modifié.....	69
Figure 2.5 : Construction d'une banque d'expression Gateway à partir des produits PCR GeneRacer.	73
Figure 2.6 : Carte du plasmide pDONR201.....	74
Figure 2.7 : Carte du plasmide pYES-DEST52.....	75

Figure 3.1 : Cinétique de la croissance racinaire de différentes variétés de blé exposées à différentes concentrations d'aluminium.	80
Figure 3.2 : Analyse des inhibitions de croissance racinaire de quatre variétés de blé après 27 heures d'exposition à l'aluminium.....	82
Figure 3.3 : Effets de l'aluminium sur l'accumulation des ARNm de quatre gènes <i>War</i> chez la variété Atlas-66 et Fredrick de blé.....	83
Figure 3.4 : Inhibitions de croissance racinaire obtenue après 24 heures d'exposition à l'aluminium de plantules d'Atlas-66 et de Fundy ayant servi à la réalisation des banques SSH 1 et 2.	84
Figure 3.5 : Analyse des inhibitions de croissance racinaire de quatre variétés de blé après 17 heures d'exposition à l'aluminium.....	85
Figure 3.6 : Analyses des inhibitions de la croissance racinaire de six variétés de blé après 17 heures d'exposition à l'aluminium.....	87
Figure 3.7 : Films d'autoradiographie de test <i>northern blot</i> réalisés à partir des inserts des clones 1, 2 et 83.	89
Figure 3.8 : Comparaison des signaux d'hybridation d'ADNc de Fundy sur les membranes des banques SSH 1 et 2.....	90
Figure 3.9 : Gel des produits de PCR nichée de différentes conditions d'ajout d'ARN lors des étapes de PCR SSH.....	91
Figure 3.10 : Nouvelle analyse <i>dot blot</i> des 100 clones ayant montré de faibles signaux dans le criblage de la banque 2.....	92
Figure 3.11 : Séquence du gène 48E8 obtenue par GeneRacer et de la protéine traduite.	94
Figure 3.12 : Autoradiographies de membranes des banques SSH 3, 4 et 5 sondées avec des produits GeneRacer.	97
Figure 3.13: <i>Northern blot</i> de différents clones de la banque 4.....	103
Figure 3.14 : Autoradiographie de <i>dot blot</i> des banques SSH 3 et 4.	104
Figure 3.15 : Gel comparatif des produits PCR nichée des banques 3, 4 et 5.	105
Figure 3.16 : Tests PCR de la qualité des banques SSH.....	106

Figure 3.17 : Comparaison de la répartition fonctionnelle des gènes identifiés par SSH.	108
Figure 3.18 : RT-PCR des gènes 48E8 et 49A1.	109
Figure 3.19 : Exemple de profils d'amplification obtenus par PCR en temps réel pour les gènes GA3PDH et 49A1 à 0 et 50 μ M d'aluminium pour les variétés Fundy et OK91G106.	111
Figure 3.20 : Représentation graphique des quantités d'ARNm du gène 49A1 relativement à ceux du gène GA ₃ PDH pour quatre variétés de blé exposées à différentes concentrations d'aluminium.	115
Figure 3.21 : Représentation graphique des quantités d'ARNm du gène 49A1 relativement à ceux du gène GA ₃ PDH pour six variétés de blé exposées à différentes concentrations d'aluminium.	118
Figure 3.22 : Effets de l'aluminium sur l'accumulation des ARNm du gène <i>War 7.2</i> chez la variété Atlas-66 et Fredrick de blé.	119
Figure 3.23 : Représentation graphique des quantités d'ARNm du gène 49A1 relativement à ceux du gène GA ₃ PDH et du gène <i>War 7.2</i> pour six variétés de blé exposées à différentes concentrations d'aluminium.	121
Figure 3.24 : Alignement de la séquence de 49A1 avec la séquence annotée de AE017085.	124
Figure 3.25 : Séquence partielle de l'EST de Norstar.	125
Figure 3.26 : Alignement de la séquence de 49A1 avec un EST du blé Norstar.	126
Figure 3.27 : Alignement entre la séquence protéique traduite de 49A1 et la séquence protéique traduite après correction de l'EST du blé Norstar.	127
Figure 3.28 : Alignement de séquence entre le fragment 49A1 et l'EST de blé CD89431.	128
Figure 3.29 : Séquence entière de l'EST CD89431.	128
Figure 3.30 : Séquence d'acides aminés traduite à partir de l'EST CD89431 de blé.	129
Figure 3.31 : Représentation par le programme TMHMM des domaines de la protéine AAP53384.	131

Figure 3.32 : Représentation par le programme SOSUI des domaines transmembranaires de la protéine AAP53384.....	131
Figure 3.33 : Représentation par le programme SOSUI des domaines transmembranaires de la protéine CD89431, protéine 49A1 hypothétique.	132
Figure 3.34 : Analyse de la séquence promotrice du gène annoté de riz AE017085.	133
Figure 3.35 : Les trois protocoles tentés pour réaliser les banques d'expression Gateway.	138
Figure 3.36 : Gel d'agarose des produits PCR GeneRacer de Fundy exposé à 5 μM d' Al^{3+}	139
Figure 3.37 : Tests PCR effectués sur les produits GeneRacer de Fundy.....	140
Figure 4.1 : Structures moléculaires de l'aspartate et du malate.	150
Figure 4.2 : <i>Northern blot</i> du gène <i>ALMT1</i>	153
Figure 4.3 : Quantification de l'inhibition de croissance racinaire des organes transgéniques surexprimant le gène de blé <i>ALMT1</i>	154
Figure 4.4 : Balayage électronique d'apex racinaire de l'orge transgénique <i>ALTM1 L5</i>	155
Figure 4.5 : Expression induite par l'aluminium du gène <i>AtALMT1</i> chez neuf variétés d' <i>Arabidopsis</i> et un mutant.....	157
Figure 4.6 : Sécrétion induite d'acides organiques au niveau de racines d' <i>Arabidopsis</i> en culture hydroponique.....	158
Figure 4.7 : Mécanisme hypothétique de la sécrétion d'acides organiques par les cellules protéoides de lupin blanc.	159
Figure 4.8 : Schéma hypothétique des transporteurs impliqués dans les mécanismes de tolérance à l'aluminium chez les plantes.	161
Figure 4.9 : Schéma du protocole standard de SSH avec les amplifications indésirables représentées.....	165
Figure 4.10 : Schéma du protocole modifié SSH.....	167

Figure 4.11 : Schéma du procédé de suppression d'amplification par l'ajout d'ARN durant les réactions de PCR.	169
Figure 4.12 : Schéma de la technique de Sélection par Orientation Miroir.....	170
Figure 4.13 : Application de la technique MOS à la SSH.	172
Figure 4.14 : Schéma du kit CloneMiner d'Invitrogen.....	176

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.1 : Les différentes variétés de blé utilisées.....	42
Tableau 2.2 : Séquence nucléotidique de l'amorce poly-dT <i>cDNA Synthesis Primer</i>	56
Tableau 2.3 : Séquences des différents adaptateurs et amorces de SSH.....	61
Tableau 2.4 : Séquences des amorces utilisées pour amplifier les gènes contrôles....	65
Tableau 2.5 : Amorces utilisées pour les tests de <i>RT-PCR</i> spécifiques des gènes 48E8 et 49A1.....	66
Tableau 2.6 : Séquences des amorces utilisées dans les réactions de PCR en temps réel.....	67
Tableau 2.7 : Séquences nucléotidiques des amorces utilisées dans le système GeneRacer.....	70
Tableau 2.8 : Séquence de l'adaptateur AttB1.	74
Tableau 3.1 : Homologies de séquence des gènes isolés par SSH.....	93
Tableau 3.2 : Analyse de séquences de cinq clones retrouvés positifs par <i>colony blot</i>	98
Tableau 3.3 : Répartition fonctionnelle des gènes isolés dans la banque 4.	99
Tableau 3.4 : Répartition fonctionnelle des gènes isolés dans la banque 5.	102
Tableau 3.5 : Quantité relative d'ARNm du gène 49A1 pour quatre variétés de blé et trois conditions d'exposition à l'aluminium.....	113
Tableau 3.6 : Quantité relative d'ARNm du gène 49A1 pour six variétés de blé et trois conditions d'exposition à l'aluminium.....	114
Tableau 3.7 : Quantité relative d'ARNm des gènes 49A1 et War 7.2 pour six variétés de blé et trois conditions d'exposition à l'aluminium.	122
Tableau 3.8 : Analyse par le programme TMHMM des positionnements des acides aminés de la protéine AAP53384.....	130
Tableau 3.9 : Tests de résistance à l'aluminium de levure exprimant le gène de Norstar homologue à 49A1.	135

Tableau 3.10 : Tests de viabilité des différentes banques Gateway.....	142
Tableau 3.11 : Séquences des clones positifs isolés.	143
Tableau 3.12 : Homologies de séquences des ADN isolés.	143
Tableau 3.13 : Tests de tolérance de clones positifs isolés après trois jours d'exposition.	143

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	acide désoxyribonucléique complémentaire
AMV	<i>Avian Myeloblastosis Virus</i>
ARN	acide ribonucléique
ARNm	acide ribonucléique messenger
ARNr	acide ribonucléique ribosomique
ARNt	acide ribonucléique de transfert
ARN poly A ⁺	ARN possédant une queue poly-adénosine et codant pour une protéine
AtNramp	<i>Natural resistance associated macrophage proteins d'Arabidopsis thaliana</i>
ATP	adénosine tri-phosphate
Atlas-66	blé tolérant Atlas-66
CDF	<i>Cation Diffusion Facilitator</i>
db	double brin
DD	ARNm <i>differential display</i> (technique de)
DNase	désoxyribonucléase
dNTP	désoxyribonucléoside triphosphate (dont dATP, dCTP, dGTP et TTP)
DO	densité optique
driver	ADNc ou ARNm servant à soustraire lors de procédé SSH
DTZ	<i>distal part of the transition zone</i> (partie distale de la zone de transition)
DTT	dithiothréitol
EDTA	éthylène diamine tétra acétate
EST	<i>expression sequence tag</i>
EZ	<i>elongation zone</i> (zone d'élongation)
Fredrick	blé sensible Fredrick
Fundy	blé sensible Fundy
GA ₃ PDH	Glyceraldehyde-3-phosphate deshydrogénase
IPTG	isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside
Km	constante d'affinité
MDH	malate deshydrogénase
MOS	<i>mirror orientation selection</i> (technique de sélection par orientation miroir)
MRP	Multi-drug resistance-associated protein
MPSS	<i>massively parallel signature sequencing</i> (technique de séquençage en parallèle de grande quantité de signature ADN)
MT	Métallothioneine
MZ	<i>meristematic zone</i> (zone méristématique)
NBT	nitro blue tetrazolium
nested PCR	PCR nichée

OA	<i>organic acid</i> (acide organique)
OK91G103	blé tolérant OK91G103
OK91G106	blé tolérant OK91G106
OK91G107	blé sensible OK91G107
OK91G108	blé sensible OK91G108
PC	Phytochélatine
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (réaction de polymérisation en chaîne)
PEP	phospho-enol-pyruvate
PEPC	phospho-enol-pyruvate carboxylase
QTL	<i>quantitative trait locus</i>
RAPD	<i>randomly amplified polymorphic DNA</i>
RDA	<i>representational difference analysis</i> (technique de)
Real Time PCR	PCR en temps réel
RFLP	<i>restriction fragment length polymorphism</i> (polymorphisme de la longueur des fragments de restriction)
RNase	ribonucléase
RGI	<i>root growth inhibition</i> (inhibition de croissance racinaire)
ROS	<i>reactive oxygen species</i> (espèces oxygénées réactives)
RT PCR	<i>reverse transcription PCR</i> (technique de transcription inverse couplée à la PCR)
SAGE	<i>serial analysis of gene expression</i> (technique de l'analyse en série de l'expression de gènes)
SDS	sodium dodécyl sulfate
SSH	<i>suppression subtractive hybridization</i> (technique d'hybridation soustractive suppressive)
tester	ADNc ou ARNm renfermant des gènes d'intérêt lors des procédés SSH
Tris	Tris(hydroxyméthyl)aminométhane
TZ	<i>transition zone</i> (zone de transition)
War	<i>wheat aluminum regulated</i> (gène de blé régulés par l'aluminium)
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside

LISTE DES SYMBOLES

A	adénine
A	alanine
Al	aluminium ou ions d'aluminium
C	cytosine
C	cystéine
D	aspartate
dA	poly-désoxyadénosine
dT	poly-désoxythymidine
E	glutamate
F	Phénylalanine
g	force de gravité (m/s ²)
g, µg	gramme, microgramme
G	guanine
G	glycine
H	histidine
I	isoleucine
K	lysine
kD	kilo Dalton
Km	constante d'affinité
L	leucine
M	méthionine
N	asparagine
nm	nanomètre
mM, µM	millimolaire, micromolaire
P	proline
pb	paire de base
pH	potentiel hydrogène
Q	glutamine
R	arginine
S	sérine
T	thymine
T	thréonine
V	valine
W	tryptophane
Y	tyrosine

RÉSUMÉ

L'aluminium est considéré comme le principal facteur limitant de la productivité des plantes dans les sols acides. Ces sols représentent 40% des terres cultivables du globe. En Amérique du Nord, ils constituent 40,9% des terres arables et sont essentiellement répartis sur les territoires canadiens. Face à l'augmentation de la population mondiale, il y a un enjeu économique important à augmenter la surface des terres cultivables et donc à pallier la phytotoxicité due à l'aluminium.

Le but de cette thèse était d'isoler des gènes de plantes conférant une résistance au métal. En effet, certaines plantes présentent une résistance plus ou moins élevée face à l'aluminium en sols acides. Des études génétiques ont montré que ce phénotype était porté par le génome nucléaire et résultait de l'expression d'un à trois gènes selon le genre végétal étudié. Une fois ces gènes isolés, il serait donc possible de transférer le caractère de résistance vers des plantes à fort intérêt agronomique.

Les travaux réalisés dans cette thèse ont consisté à appliquer deux approches de biologie moléculaire pour mettre en évidence des gènes impliqués dans la résistance : l'Hybridation Suppressive Soustractive (SSH) et la construction de banques d'expression de protéines via les systèmes GeneRacer/Gateway. Ces techniques ont été utilisées pour rechercher des gènes de tolérance chez deux types de plantes résistantes : le blé Atlas-66 et le riz (naturellement très résistant).

Un nouveau système de banque d'expression de protéines a été mis au point pour permettre de réaliser des banques à partir de petites quantités d'ARNm et d'exprimer ces banques dans différents organismes. Aucun gène de résistance n'a pu être isolé à partir de ces banques.

Face au faible rendement de la SSH, de nouveaux procédés de suppression PCR ont été élaborés. Ces procédés ont été nommés Suppression PCR par Remplissage des Extrémités et Suppression PCR par Ajout d'ARN. Ces améliorations techniques ont permis d'augmenter de manière significative la qualité des banques SSH obtenues. Un gène surexprimé chez la variété tolérante de blé Atlas-66 a été isolé: le gène 49A1. Ce gène confère une résistance modérée chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* et présente de fortes homologies avec des transporteurs d'oligo-peptide proton dépendants. Son homologue chez le riz possède une dizaine d'hélices trans-membranaires et un promoteur avec de nombreux éléments de régulation DOFCOREZM impliqués dans le métabolisme du carbone. Le gène 49A1 pourrait s'avérer être un élément clef de la tolérance à l'aluminium chez les plantes par son implication hypothétique dans les mécanismes de sécrétion du malate. En effet, ces mécanismes sont considérés par certains chercheurs comme un élément pouvant mener à la résistance au métal. Son expression chez les plantes pourrait permettre d'obtenir des plantes génétiquement modifiées tolérantes au métal.

INTRODUCTION

Des études écologiques réalisées en 1995 ont permis d'estimer que la production agricole mondiale devrait augmenter de 40% d'ici l'an 2020 pour être en mesure de répondre au besoin alimentaire des populations du globe (**Gruhn *et al.*, 1995**). Or ces perspectives d'avenir se heurtent au fait que la surface des terres cultivables est limitée. De plus, 40% des terres arables du globe sont des sols acides, des sols impropres à l'agriculture (**Foy *et al.*, 1978**). Des études physiologiques ont démontré que la faible productivité agricole des sols acides était liée à la phytotoxicité de l'aluminium, un métal qui constitue près de 7,5% de la lithosphère (**Foy *et al.*, 1978 ; Haug, 1984**). Dans les sols dits acides, où l'unité de pH est inférieure à 5, l'aluminium est alors présent sous des formes toxiques pour les plantes.

Afin de pallier la phytotoxicité due à l'aluminium, beaucoup de stratégies ont été envisagées. La première a consisté en l'épandage de chaux sur les sols acides dans le but d'en élever le pH. Cependant, cette stratégie étant fort coûteuse, les agronomes se sont alors tournés vers la sélection génétique de genres et de variétés de plantes tolérant la présence du métal. De telles sélections phénotypiques sont limitées à la diversité génétique naturelle. Elles ne peuvent pas être appliquées à tous les genres de plantes notamment aux plantes d'intérêts agronomiques qui sont choisies avant tout pour leurs caractères qualitatif et quantitatif. Grâce aux progrès des biotechnologies, la possibilité de transférer des caractères de tolérance d'une plante résistante vers une plante sensible ouvrait de nouveaux horizons aux scientifiques et agronomes. Dans ce but, il était nécessaire de déterminer la nature du support génétique responsable de la résistance à l'aluminium pour pouvoir améliorer génétiquement les variétés d'intérêt agronomique.

La tolérance observée chez la variété de blé tolérante Atlas-66 est un caractère multigénique héréditaire dominant porté par le génome nucléaire (**Berzonsky, 1992**). Afin de transférer génétiquement les caractères de résistance, il est donc nécessaire d'isoler les gènes responsables de cette tolérance. De nombreuses études ont été réalisées afin de déterminer la nature de ces gènes, leurs localisations chromosomiques et les mécanismes impliqués. Cependant, jusqu'à ces dernières années, aucun gène conduisant à une tolérance à l'aluminium n'avait été identifié chez les plantes. Tout dernièrement, un gène accordant une grande tolérance à l'aluminium fût isolé à partir du blé (**Sasaki *et al.*, 2004 ; Delhaize *et al.*, 2004**). Cependant, bien que ce gène soit important pour la résistance au métal, il ne semble pas être le gène majeur de la réponse induite de résistance face à la présence d'aluminium (**Hoekenga *et al.*, 2006**). En somme, les mécanismes de tolérance à l'aluminium chez les plantes restent encore à ce jour méconnus.

L'objectif principal de cette thèse était d'isoler des gènes impliqués dans les mécanismes de tolérance à l'aluminium chez la variété tolérante de blé Atlas-66 et le riz, une plante très tolérante au métal. Différentes hypothèses pouvaient être faites quant à la nature des gènes responsables de la tolérance à l'aluminium : (i) ces gènes sont uniquement présents chez les plantes tolérantes, (ii) ces gènes sont présents chez toutes les variétés mais régulés de façon différente, (iii) les gènes responsables de la tolérance codent pour des isoformes des protéines des variétés sensibles, ces isoformes de protéines confèreraient la résistance à l'aluminium. Les travaux décrits dans cette thèse avaient pour but de tester ces différentes hypothèses à l'aide de deux approches de biologie moléculaire : d'une part l'Hybridation Suppressive Soustractive pour les hypothèses (i) et (ii) et d'autre part l'expression de banque de protéines pour l'hypothèse (iii).

La majeure partie des travaux de cette thèse a consisté à appliquer la technique SSH (**Diatchenko *et al.*, 1996**) entre les ARN messagers d'une variété

tolérante de blé (Atlas-66) et ceux d'une variété sensible (Fundy) exposées à des concentrations d'aluminium conduisant à des inhibitions de croissance racinaire similaires. À de telles concentrations de métal, les deux variétés utilisées sont dans des états de stress très similaires : leurs croissances racinaires sont inhibées de manière identique et les gènes de stress sont surexprimés à des niveaux comparables (Hamel *et al.*, 1998). Les premières banques SSH réalisées ne donnant pas des résultats satisfaisants, la technique SSH standard a alors été modifiée pour en augmenter l'efficacité. Grâce à ces modifications, un gène induit par l'aluminium et sur-exprimé chez les variétés tolérantes de blé a été isolé. De plus, le gain d'efficacité des améliorations apportées à la SSH a été validé par la comparaison des PCR entre le protocole standard SSH et les protocoles modifiés.

Une autre partie des travaux de thèse a consisté à mettre en place de nouvelles stratégies de banque d'expression de protéines chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Ces banques devaient permettre d'isoler les isoformes de gènes du blé Atlas-66 et du riz conférant la tolérance à l'aluminium. Grâce au système de recombinaisons Gateway (INVITROGEN), ces banques sont directement transmissibles chez *Arabidopsis thaliana* pour des études futures à grande échelle chez cette plante. Malheureusement, à ce jour, les premières banques d'expression de protéines réalisées chez *Saccharomyces cerevisiae* n'ont pas permis d'isoler des isoformes de tolérance.

CHAPITRE I

ÉTAT DES CONNAISSANCES

1.1. MÉCANISMES MOLÉCULAIRES DE L'HOMÉOSTASIE ET DE LA TOLÉRANCE AUX MÉTAUX LOURDS CHEZ LES PLANTES

Tous les métaux présents dans les sols peuvent être classés dans deux grandes catégories de micronutriments : les métaux essentiels pour les plantes et les métaux non-essentiels ou toxiques. Dans les métaux considérés comme essentiels, on retrouve principalement le fer, le cuivre, le nickel et le zinc. Par exemple, le zinc est souvent retrouvé comme co-facteur de plusieurs enzymes (**Clarke and Berg, 1998**) alors que le cuivre et le fer sont plutôt impliqués dans des réactions de transfert d'électrons. La croissance et le développement normaux des plantes sont alors assurés par des mécanismes qui maintiennent des concentrations internes en métaux essentiels entre des niveaux de déficience et de toxicité. Dans les métaux considérés comme non-essentiels, on retrouve principalement le cadmium, le plomb, le mercure, le cobalt et l'aluminium. Ces métaux sont présents à des taux toxiques dans des sols naturels ou des sols ayant été contaminés par l'activité humaine. Ils n'interfèrent pas dans la croissance et le développement des plantes tant qu'ils restent à des concentrations en dessous de leurs seuils de toxicité. Le potentiel toxique de ces métaux lourds est dû à leur grande réactivité avec les atomes de soufre et d'azote (cadmium, plomb, mercure) voir d'oxygène (aluminium) (**Rausser, 1999**). Les

mécanismes mis en place par les plantes pour maintenir les concentrations en métaux lourds entre déficience et/ou toxicité sont principalement des mécanismes qui touchent le transport, la chélation et la séquestration (Clemens 2001, Figure 1.1). La régulation de ces mécanismes assure une bonne distribution des ions métalliques au niveau cellulaire et de la plante entière. Elle implique des absorptions, des déplacements, des accumulations voir des détoxification des molécules métalliques.

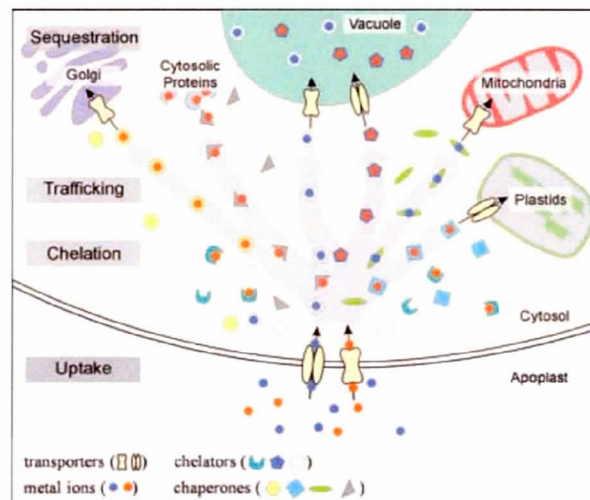


Figure 1.1 : Schéma hypothétique simplifié de l'homéostasie cellulaire des métaux chez les plantes.

Après l'absorption grâce à des transporteurs, les ions métalliques sont pris en charge par des molécules chélatrices ou chaperonnes. Les éléments chélateurs maintiennent des concentrations cytosoliques stables alors que les éléments chaperonnes sont impliqués dans la circulation des métaux. Les ions métalliques essentiels sont alors spécifiquement délivrés à des protéines cytosoliques ou des organelles où ils sont requis. L'absorption dans les organelles implique des pompes qui interagissent directement avec des chaperonnes. La circulation à l'intérieur de l'organelle est alors assurée par de nouvelles molécules chaperonnes. La détoxification et le stockage impliquent pour leur part une séquestration des ions métalliques dans la vacuole via des transporteurs et des complexes avec des molécules chélatrices. (d'après Clemens, 2001).

Les mécanismes d'homéostasie et de tolérance sont généralement ubiquitaires à tous les genres botaniques. Cependant, certaines espèces ou génotypes de plantes peuvent montrer des comportements atypiques en poussant sur des sols normalement toxiques pour la plupart des végétaux. Les scientifiques qualifient ce phénomène d'hypertolérance et il est spécifique de certains genres de plantes pour certains types de métaux uniquement (**Schat and Vooijs, 1997**). Certaines plantes hypertolérantes peuvent aussi se révéler être des hyperaccumulateurs. Environ 400 différentes espèces végétales ont été classées comme hyperaccumulateurs (**Baker and Brooks, 1989**). Il s'agit de plantes pouvant accumuler plus de 0,1% de leur poids sec en éléments comme le nickel, le cobalt ou le plomb, plus de 1% pour le zinc ou 0,001% pour le cadmium. Ce phénotype d'hyperaccumulation est la base de la phytoremédiation, c'est-à-dire l'utilisation d'hyperaccumulateur pour nettoyer les sols contaminés par des métaux lourds (**Chaney et al., 1997**).

1.1.1. L'ABSORPTION DES IONS MÉTALLIQUES

Par des expériences de complémentations de mutants de *Saccharomyces cerevisiae*, des ADNc codant pour des transporteurs de micronutriments métalliques ont été identifiés (**Figure 1.2**). *COPT1* est un gène d'*Arabidopsis thaliana* complétant le mutant *ctr1-3* de *Saccharomyces cerevisiae* déficient dans l'absorption de cuivre. Il est suspecté d'être un transporteur du cuivre même si aucun ARNm de ce gène n'est détecté dans les racines des plantes (**Kampfenkel et al., 1995**). Pour le fer, les gènes *IRT1*, *AtNramp1*, *AtNramp2*, *AtNramp3*, *AtNramp4* et *AtNramp5* (*Natural resistance associated macrophage proteins*) d'*Arabidopsis* sont capables de compléter les mutants *fet3 fet4* de *Saccharomyces cerevisiae* (**Eide et al., 1996 ; Curie et al., 2000 ; Thomine et al., 2000**). Le transporteur *IRT1* est capable de transporter le manganèse et le zinc (**Korshunova et al., 1999**). Un autre exemple sont les gènes d'*Arabidopsis* *ZIP1*, *ZIP2*, *ZIP3*, *ZIP4*, et le gène *ZNT1* de

Thlaspi caerulescens capables de compléter les mutants déficients en zinc *zrt1* et *zrt2* de la levure (Grotz *et al.*, 1998 ; Guerinot et Eide 1999 ; Pence *et al.*, 2000).

A l'inverse des métaux essentiels pour les plantes, aucune fonction biologique n'a été mise en évidence pour les métaux toxiques tels que le plomb, le mercure, le cobalt ou l'aluminium à l'exception du cadmium pour le genre de diatomée *Thalassiosira weissflogii*. Dans ce rare cas, des chercheurs ont mis en évidence l'utilisation du cadmium pour remplacer le zinc lors de l'acquisition du CO₂ dans des milieux pauvres en zinc (Lane et Morel, 2000). Leurs travaux ont relaté l'existence d'une anhydrase carbonique cadmium spécifique pouvant remplacer l'anhydrase carbonique zinc spécifique endogène TWCA1 lors de croissance dans des milieux pauvres en zinc. À l'exception du rare cas de *Thalassiosira weissflogii*, il est généralement admis qu'il n'existe aucun transporteur spécifique des métaux lourds chez les plantes (Clemens 2001) et que l'absorption de ces éléments toxiques se fasse par des transporteurs normalement dédiés à d'autres métaux. Un exemple bien documenté est celui de l'absorption aspécifique d'ions métalliques lors d'une déficience en fer (Cohen *et al.*, 1998).

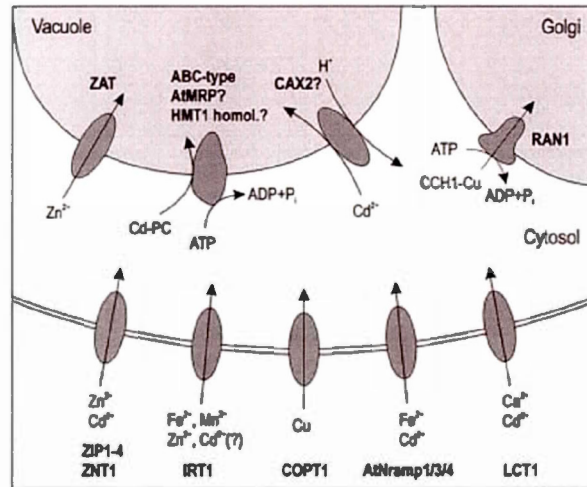


Figure 1.2 : Transporteurs de métaux identifiés chez les plantes.

Les différents transporteurs de diverses plantes sont représentés avec leurs substrats respectifs. La localisation précise reste hypothétique pour certaines protéines. HMT1 est un ABC transporteur retrouvé chez *Schizosaccharomyces pombe*. (d'après Clemens 2001).

D'une façon assez similaire, de nombreux travaux ont aussi mis en évidence le transport de cadmium par les transporteurs *IRT1*, *ZNT1* et *AtNramp3* normalement dédiés à des métaux essentiels (Figure 1.2 ; Korshunova *et al.*, 1999 ; Pence *et al.*, 2000 ; Thomine *et al.*, 2000). La présence d'ions toxiques dans l'environnement des plantes implique donc des mécanismes permettant de neutraliser de telles molécules avant ou après leur entrée dans les cellules végétales.

1.1.2. LA SÉQUESTRATION DES IONS MÉTALLIQUES : MÉCANISME DE LA TOLÉRANCE AU ZINC ET CADMIUM

1.1.2.1 Les molécules chaperonnes et de transport

L'exemple le plus détaillé du transport d'ions métalliques est celui du cuivre chez *Saccharomyces cerevisiae*, l'homme et *Arabidopsis*. Chez la levure, plusieurs protéines chaperonnes du cuivre ont été isolées. Par exemple, yCCS est une protéine chaperonne essentielle pour le transfert de cuivre à la superoxyde dismutase SOD1 (Culotta *et al.*, 1997) alors que COX17 délivre du cuivre au complexe du cytochrome c (Glerum *et al.*, 1996). La protéine ATX1 quant à elle permet le transfert de cuivre dans les vésicules post-Golgi via une pompe ATP dépendante nommée CCC2 (Fu *et al.*, 1995 ; Pufalh *et al.*, 1997). Des homologues à ATX1 ont été retrouvés chez l'homme (Klomp *et al.*, 1997) et *Arabidopsis* (Himmelblau *et al.*, 1998). Chez cette même plante, un autre gène impliqué dans le transport du cuivre a été isolé : RAN1 (Hirayama *et al.*, 1999 ; Woeste et Kieber, 2000). Ce gène est capable de restaurer la mutation *ccc2Δ* chez *Saccharomyces cerevisiae*. L'identification des protéines RAN1 et de l'homologue à ATX1 fait ainsi suggérer aux scientifiques que le réseau de circulation de l'ion cuivre chez les cellules de plantes serait similaire à celui retrouvé chez l'homme et la levure (Himmelblau et Amasino, 2000 ; Woeste et Kieber, 2000). En somme, les molécules chaperonnes sont importantes pour le transport des ions métalliques vers les organelles de la cellule végétale mais ils ne constituent pas un mécanisme de tolérance en tant que tel.

1.1.2.2 Les transporteurs ABC et CDF : éléments clefs de la séquestration vacuolaire

A l'approche des organelles, les ions métalliques sont alors pris en charge par de nouveaux types de transporteurs. Chez *Arabidopsis*, de nombreuses séquences MRPs (*multi-drug resistance-associated protein*) ont été isolées (Lu *et al.*, 1997 ; Lu *et al.*, 1998 ; Tommasini *et al.* 1998). Ces AtMRP sont considérés comme étant les médiateurs du transport à travers la membrane vacuolaire, le tonoplaste, de complexe phytochélatine-cadmium (Rea *et al.*, 1998). Un autre type de transporteurs d'ions métalliques a été identifié : il s'agit des facilitateurs de la diffusion de cations (*Cation Diffusion Facilitator* ou CDF). Le premier gène CDF isolé chez les plantes fût le gène CAX2 d'*Arabidopsis*. Ce gène est considéré comme étant un antiport proton/métaux lourds (Hirschi *et al.*, 1996). Un second gène CDF a été caractérisé quelques années après. Il s'agit du gène ZAT d'*Arabidopsis* (van der Zaal *et al.*, 1999). Il coderait pour un transporteur au zinc au niveau du tonoplaste.

Une fois les molécules métalliques rentrées dans la vacuole ou l'appareil de Golgi, de nouvelles molécules chélatrices entrent en jeu afin de complexer les ions à l'intérieur de l'organelle et ainsi contrôler leur concentration cytosolique. Pour l'instant, la nature exacte de ces molécules n'a pas été identifiée mais il s'agirait de phytochélatine (Clemens, 2001). Cependant, les scientifiques s'accordent à dire que la séquestration vacuolaire par l'intermédiaire de transporteurs spécifiques est un mécanisme de détoxification du cadmium ou d'un excès de zinc.

1.1.3. LA CHÉLATION DES IONS MÉTALLIQUES : MÉCANISME DE LA TOLÉRANCE AU CUIVRE, AU NICKEL ET À L'ALUMINIUM

Des travaux publiés en 1999 ont démontré qu'il n'y aurait qu'un seul ion métallique de cuivre libre par cellule de levure (**Rae et al., 1999**). Ceci suggère une grande efficacité des mécanismes chélatant les ions métalliques. On distingue quatre grands types de molécules chélatrices d'ions métalliques chez les plantes : les phytochélatines, les métallothioneines, les acides organiques et les acides aminés.

1.1.3.1 Les phytochélatines et métallothioneines : molécules de détoxification

Comme il a été précisé précédemment, les phytochélatines seraient importantes dans la séquestration du cadmium et du zinc au niveau de la vacuole. Cependant, les phytochélatines peuvent aussi complexer d'autres métaux comme l'argent, le cuivre (**Maitani et al., 1996**) et l'arsenic (**Schmöger et al., 2000**). Les phytochélatines (PC) sont des petits peptides capables de lier les métaux et présentant une structure générale $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$, $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Ser}$, $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-}\beta\text{-Ala}$, $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Glu}$, ou encore $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n$ ($n=2-11$) (**Kondo et al., 1984 ; Grill et al., 1985 ; Jackson et al., 1987 ; Rauser, 1995 ; Rauser, 1999**). Les phytochélatines sont synthétisées à partir de glutathion par une PC synthétase dans les quelques minutes suivant une exposition à des molécules métalliques (**Grill et al., 1989**). Deux gènes de PC synthétase ont été isolés : un chez *Arabidopsis AtPCS1* (**Ha et al., 1999**), et un autre chez le blé *TaPCS1* (**Vatamaniuk et al., 1999 ; Clemens et al., 1999**). La surexpression de ces gènes dans la levure confère une tolérance au cadmium, au mercure et à l'arsenic (**Vatamaniuk et al., 1999**). Cependant, la sensibilité au zinc, nickel et cuivre n'est pas diminuée. Cette constatation laisse les scientifiques penser que les phytochélatines sont importantes pour la détoxification des métaux mais qu'elles ne constituent pas la base des tolérances métaux-spécifiques observées chez les plantes.

Les métallothioneines (MT) constituent une autre famille de protéines pouvant chélater les ions métalliques. Plus d'une cinquantaine de métallothioneines ont été identifiées chez différentes plantes (**Rausser, 1999**). Plusieurs classes de ces protéines existent selon le réarrangement de cystéines des motifs MT : type 1, exclusivement Cys-X-Cys ; type 2, combinaison de Cys-X-Cys, Cys-Cys, et Cys-X-X-Cys. Certains chercheurs ont posé l'hypothèse que la différence des motifs de cystéines pourrait suivre la spécificité du métal lié (**Robinson et al., 1993**). Chez *Arabidopsis*, de nombreux gènes de métallothioneines ont été identifiés dont notamment les gènes *MT1* et *MT2* (**Murphy et al., 1997**). Ces deux gènes sont capables de supprimer l'hypersensibilité au cuivre des mutants *cup1Δ* de levure (**Zhou et Goldsbrough, 1994**). Ils sont aussi capables d'augmenter la tolérance au cadmium (**Zimeri et al., 2005**). Enfin, le gène *MT2* diminue la sensibilité au zinc du mutant *MtsmtA* de *Synechococcus* (**Robinson et al., 1996**). En somme, les métallothioneines ont divers rôles dans l'homéostasie des métaux : détoxification (essentiellement du cuivre), maintien de la concentration cytosolique (zinc). Cependant, les fonctions de ces protéines restent énigmatiques (**Palmiter, 1998**) et ne semblent pas être liées au phénomène d'hypertolérance à l'exception du cuivre chez *Arabidopsis* (**Murphy et Taiz, 1995**).

1.1.3.2 Histidines et acides organiques : molécules responsables de la tolérance au nickel et à l'aluminium

La comparaison de 2 genres de brassicacées *Alyssum*, une nickel-hyperaccumulatrice, *Alyssum lesbiacum*, l'autre non-accumulatrice *Alyssum montanum* a montré l'importance de l'acide aminé histidine dans le mécanisme de tolérance au nickel (**Krämer et al., 1996**). L'observation principale fût la présence de métal dans les apex végétatifs mais aucune dans les apex racinaires chez *Alyssum lesbiacum* suggérant un transport du métal des racines vers les appareils aériens chez

le genre hyperaccumulateur. Une augmentation du taux d'histidine dans les vaisseaux du xylème fût aussi observée uniquement pour le genre hyperaccumulateur. Les chercheurs ont alors réussi à démontrer la fixation de zinc sur l'acide aminé histidine par des études aux rayons X. L'histidine serait donc un acide aminé capable de chélater le zinc de façon spécifique et permettrait une hyperaccumulation de ce métal. Cependant, il semblerait que ce mécanisme soit spécifique du genre *Alyssum* car il ne fût pas retrouvé chez la plante *Thlaspi goesingense* (Persans *et al.*, 1999).

La très grande réactivité des ions métalliques avec les atomes de soufre, d'azote et d'oxygène place les acides carboxyliques comme des ligands potentiels des métaux. Citrate, malate et oxalate sont impliqués dans différents mécanismes comme le transport et la séquestration vacuolaire des métaux (Rauser, 1999). Cependant, la seule tolérance qui leur est associée à ce jour est celle à l'aluminium (Delhaize et Ryan, 1995). Des chercheurs ont en effet démontré que la sécrétion d'acides organiques au niveau des apex racinaires permet une chélation du métal aluminium à l'extérieur de l'organisme. L'aspect de la toxicité et de la tolérance à l'aluminium chez les plantes sera détaillé dans les prochains paragraphes.

1.2. LA PHYTOTOXICITÉ DE L'ALUMINIUM

Les mécanismes biologiques conduisant à l'effet toxique de l'aluminium chez les plantes sont encore méconnus et controversés. La difficulté de compréhension repose surtout sur le problème de normalisation des résultats entre les différents types de plantes étudiées et sur les conditions d'expositions au métal utilisées décrites dans la littérature. Cependant, différents aspects de la phytotoxicité à l'aluminium ont été mis en évidence et validés par un grand nombre de chercheurs : l'apex racinaire constituerait la cible initiale des formes toxiques du métal. Le métal entrerait en des temps très courts dans les cellules et il pourrait agir sur diverses cibles intra-

cellulaires conduisant à terme à la mort de la plante s'il est présent à de fortes concentrations.

1.2.1. LES SOLS ACIDES : LIEUX NATURELS DE LA TOXICITÉ À L'ALUMINIUM

L'aluminium est l'un des métaux les plus abondants de la croûte terrestre. Dans les sols acides, la toxicité due à l'aluminium est considérée comme le facteur limitant de la productivité des plantes (Foy *et al.*, 1978). En effet, à pH acide, le métal est alors présent sous des formes ioniques toxiques absorbables par les plantes. La phytotoxicité de l'aluminium se traduit en général par une chlorose foliaire, de petites feuilles, une croissance végétative ralentie, une floraison réduite, un brunissement des racines et une inhibition de la croissance racinaire (Foy *et al.*, 1978 ; Taylor, 1988). Environ 40% des terres arables du globe sont acides (Foy *et al.*, 1978). En 1995, Von Uexküll et Mutert ont affirmé que 40,9% des terres arables du continent Nord américain étaient des sols acides principalement répartis sur les territoires canadiens (Figure 1.3).

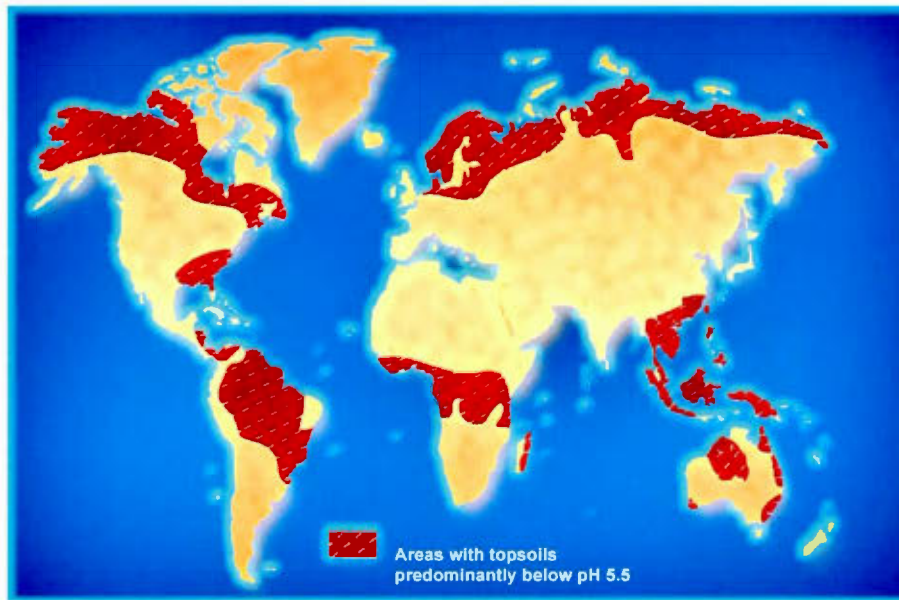


Figure 1.3 : Répartition des sols acides à travers le monde.
(d'après Von Uexküll et Mutert, 1995)

En fait, l'aluminium constitue près de 7,5% de la lithosphère (**Haug, 1984**). Dans un sol à pH neutre, il est retrouvé sous des formes complexées non toxiques pour les plantes : aluminosilicates ($\text{Al}_2\text{O}_5\text{Si}$), oxydes d'aluminium (Al_2O_3), gibbsite ($\text{Al}(\text{OH})_3$), lié à des minéraux ou à des composés organiques insolubles. Ce n'est que lors de l'acidification de ces sols ($\text{pH} < 5$) que ces complexes sont dissociés, libérant la forme phytotoxique $\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$ (Al^{3+} par convention) (**Delhaize et Ryan, 1995**).

1.2.2. L'APEX RACINAIRE : CIBLE INITIALE DE L'ALUMINIUM

Le premier effet physiologique observable dû à la présence de formes d'aluminium phytotoxiques est l'inhibition de la croissance racinaire (Taylor, 1988). Elle est toujours accompagnée d'un enfllement et d'un brunissement des apex racinaires (Figure 1.4), de la disparition du mucilage et d'une augmentation de la vacuolisation des cellules épidermiques et corticales (Foy *et al.*, 1978 ; Delhaize et Ryan, 1995).

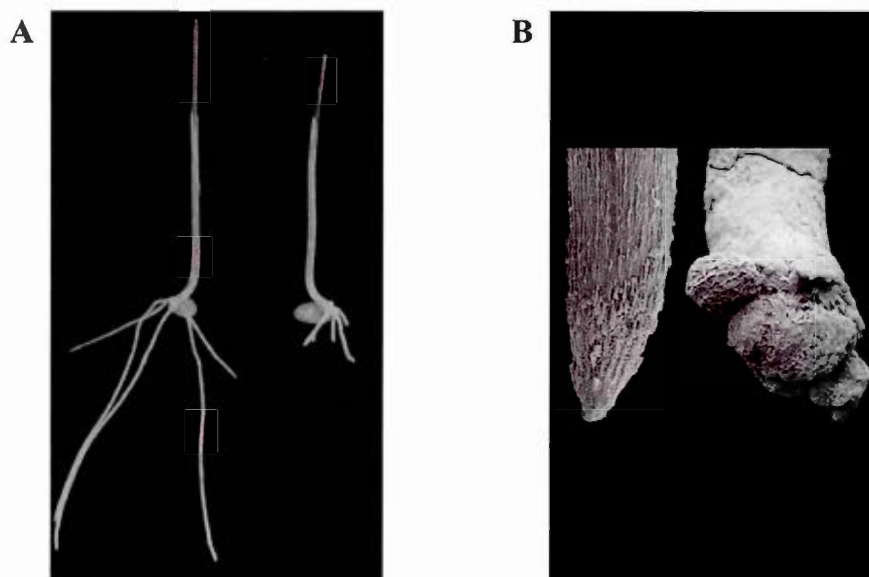


Figure 1.4 : Effet de l'aluminium sur la croissance des racines et sur la structure des apex racinaires.

Des plantules de deux lignées iso-géniques de blé, l'une tolérante, l'autre sensible, ont été mises à germer dans une solution contenant 5 μM d' AlCl_3 et 200 μM de CaCl_2 à pH4,3 pendant 4 jours.

En A : photographie d'une plantule tolérante à gauche et d'une plantule sensible au métal à droite.

En B : photographie des apex racinaires d'une plantule tolérante à gauche et d'une plantule sensible au métal à droite.

(d'après Delhaize et Ryan, 1995).

Des chercheurs ont observé en 1995 que l'inhibition de croissance des racines de variétés sensibles de maïs (*Zea mays* L.) intervenait dès les 30 premières minutes d'exposition à l'aluminium suggérant une réponse rapide de la plante à la présence du métal (Llugany *et al.*, 1995).

D'autres équipes ont démontré que seule une exposition à l'aluminium localisée au niveau des 3 premiers millimètres des pointes de racines de maïs provoque une inhibition de la croissance racinaire (Ryan *et al.*, 1993). Quand le métal est appliqué sélectivement à des régions des racines autres que l'apex, la croissance n'est pas affectée. Ces 3 premiers millimètres recouvrent le méristème (MZ) et la zone de transition (TZ) (Figure 1.5).

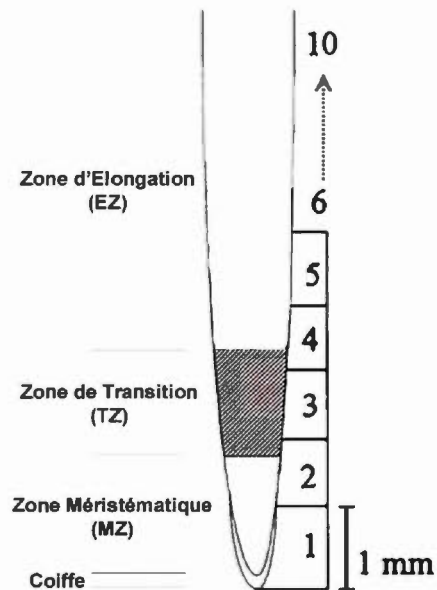


Figure 1.5: Les différentes régions de l'apex racinaire de maïs (*Zea mays* L. cv Lixis) (d'après Sivaguru et Horst, 1998).

Des études plus approfondies réalisées par la suite ont mis en évidence que la partie distale de la zone de transition (DTZ) serait la cible initiale de l'aluminium (**Sivaguru et Horst, 1998**). Cette zone de transition est caractérisée par une différenciation des cellules. En effet, les cellules de la zone de transition passent d'un mode mitotique vers une phase préparatoire à une élongation rapide (**Baluška et al., 1996**). Pour des temps d'exposition relativement courts (1 heure), les scientifiques ont observé une altération des microtubules du cytosquelette ainsi qu'une augmentation des espaces intercellulaires chez les cellules de l'épiderme et du cortex externe de la zone distale (DTZ). Lorsque le temps d'exposition est augmenté (6 heures), les microtubules présentent une altération plus prononcée alors que les cellules de la zone d'élongation (EZ) et de la coiffe ne présentent pas d'altération. De plus, des dépôts de callose apparaissent fortement dans la DTZ et de façon beaucoup moindre dans la EZ et la coiffe, les autres types cellulaires ne présentant aucun dépôt (**Sivaguru et Horst, 1999**). Toutes ces modifications confirment l'idée que la DTZ constitue la cible initiale du métal. De plus, il est connu que le cycle mitotique des racines est d'une durée de 18 à 24 heures et ne contribue donc qu'à 1 à 2 % de l'allongement des racines. Ainsi, l'inhibition rapide de la croissance racinaire suite à une exposition à l'aluminium serait due à une inhibition de l'élongation des cellules plutôt qu'à un arrêt de la division cellulaire confirmant là encore la DTZ comme une cible initiale de la phytotoxicité de l'aluminium.

Consécutivement à ces découvertes, **Kollmeier et al. (2000)** ont repris les travaux de **Hasenstein et Evans (1988)** démontrant l'inhibition du transport basipétal de l'auxine par l'aluminium. Ils ont découvert qu'un apport d'auxine exogène dans la EZ permettait d'augmenter significativement la croissance racinaire chez le maïs sensible Lixis et le tolérant ATP-Y dont la DTZ était exposée au métal. Il y aurait une étroite relation entre l'inhibition de croissance des racines due à l'exposition de la DTZ à l'aluminium et l'arrêt du transport de l'auxine du méristème vers la EZ. De plus, dans les mêmes conditions d'exposition de la DTZ à l'aluminium, ils ont observé qu'un apport d'auxine exogène dans le méristème apical permettait de pallier

l'inhibition de croissance racinaire mais uniquement chez la variété tolérante ATP-Y par le biais d'une augmentation du taux d'auxine transportée vers la EZ. Les auteurs en concluent que la DTZ est bien la cible initiale de l'aluminium mais aussi qu'elle constitue le site où s'expriment les différences génotypiques des plantes dans leur tolérance au métal (**Kollmeier et al., 2000**).

1.2.3. LOCALISATION CELLULAIRE DE L'ALUMINIUM

Des études ont montré que l'aluminium entrait en des temps très courts (30 minutes) dans les cellules des racines de soja (**Lazof et al., 1994**). D'autres chercheurs ont confirmé la présence du métal au bout de ce même laps de temps dans les noyaux de méristème racinaire du soja sensible Young (**Silva et al., 2000**). Ce temps correspond aussi à l'arrêt de croissance des racines de maïs sensibles exposés au métal (**Llugany et al., 1995**).

D'autres travaux ont démontré qu'après 4 heures d'exposition du maïs tolérant C 125 M, l'aluminium était retrouvé au niveau de la paroi des cellules des racines et au niveau des vacuoles des cellules du cortex interne racinaire (**Vásquez et al., 1999**). L'aluminium entre donc très rapidement dans les cellules des racines et se retrouve présent au niveau de leurs noyaux et de leurs différentes structures cellulaires.

1.2.4. DÉRÉGULATION DU POTENTIEL MEMBRANAIRE

La membrane plasmique est depuis longtemps soupçonnée d'être un des sites d'action de l'aluminium (**Kochian, 1995**).

Chez le blé et la betterave à sucre (*Beta vulgaris*), des équipes de chercheurs ont mis en évidence une hyperpolarisation de la membrane plasmique des cellules des racines suite à des expositions à l'aluminium (**Lindberg et al., 1991** ; **Kinraide,**

1993 ; Lindberg et Strid, 1997). Ce changement de potentiel de membrane serait lié à une diminution de la concentration cytosolique en potassium (**Gassmann et Schroeder, 1994**) et de l'augmentation de la concentration cytosolique en proton (diminution du pH intracellulaire). Il ne serait pas lié aux changements de l'homéostasie calcique (**Lindberg et Strid, 1997**).

Epstein et collaborateurs (**1963**) ont été les premiers à mettre en évidence l'existence de deux mécanismes de transport du potassium. Un premier mécanisme utilise des transporteurs à faible affinité (K_m de 14 à 40 μM). Un second mécanisme utilise des transporteurs de haute affinité (K_m de 4 à 16 μM). De ces deux systèmes, d'autres auteurs ont prouvé que le système mis en jeu dans l'élaboration du potentiel de membrane est celui utilisant les transporteurs à faible affinité et que ce système est sensible à l'aluminium (**Gassmann et Schroeder, 1994**). Des études supplémentaires ont montré que ces canaux transporteraient le potassium en symport avec des protons et qu'ils seraient sensibles au pH (**Schachtman et Schroeder, 1994**).

Des équipes japonaises ont aussi observé une forte inhibition de l'influx net de potassium, une réduction de l'efflux de proton et une dépolarisation de la membrane plasmique chez les racines d'une variété sensible de blé exposée au métal à un pH de 4,5 (**Miyasaka et al., 1989**). Ces changements n'étaient pas observés chez une variété tolérante. Toutefois, ces résultats sont remis en cause par les travaux d'autres équipes de scientifiques qui n'observèrent aucune de ces différences entre les variétés de blé tolérante et sensible (**Lindberg et Strid, 1997**). En fait, leurs travaux mettent seulement en relief l'incapacité de la variété sensible qu'ils utilisaient à retrouver rapidement un potentiel de membrane optimum par rapport à la variété tolérante lorsqu'ils exposaient ces plantes à 50 μM d'aluminium. En somme, le potentiel membranaire est bien affecté par l'aluminium lors d'exposition à pH acide mais la membrane plasmique ne semble pas être le lieu où s'exprime les différences phénotypiques de tolérance.

1.2.5. LES VOIES DE SIGNALISATION

L'aluminium peut rompre l'homéostasie du calcium intracellulaire. Lors d'exposition au métal, une augmentation de la concentration calcique cytosolique a été observée chez deux variétés sensible et tolérante de blé et chez *Arabidopsis thaliana* (Lindberg et Strid, 1997 ; Jones *et al.*, 1998a) alors qu'une diminution était constatée chez le tabac (*Nicotiana tabacum* L.) (Jones *et al.*, 1998b). Cependant, la rupture de l'homéostasie du calcium ne peut être corrélée à l'inhibition de croissance des racines. En effet, il a été observé chez le blé sensible Scout-66 que l'aluminium à de faibles concentrations peut inhiber la croissance racinaire sans affecter la prise de calcium (Ryan *et al.*, 1994). De plus, Huang *et al.* (1996) ont montré qu'à des fortes concentrations, l'aluminium pouvait inhiber de façon identique les canaux calciques voltages dépendant membranaires des variétés sensibles (Scout-66) et tolérantes (Atlas-66) de blé. Ainsi, les changements de concentrations du calcium intracellulaire seraient une réponse tardive aux phénomènes généraux de stress subis par les plantes (Jones *et al.*, 1998a) et ne présenteraient aucune corrélation avec les mécanismes de tolérance.

Une autre voie de signalisation perturbée par la présence du métal est celle de l'inositol triphosphate. En effet, d'autres travaux ont mis en évidence que l'aluminium altérerait cette voie en inhibant spécifiquement la phospholipase C (Jones et Kochian, 1995). Cette protéine étant bloquée, il est alors impossible d'activer la voie de l'inositol par d'autres facteurs notamment le calcium.

1.2.6. L'ADN

Depuis plusieurs années, les groupements phosphates des doubles hélices d'ADN sont considérés comme des cibles potentielles de l'aluminium (Taylor, 1988). De nombreuses études ont été poursuivies pour établir une corrélation entre l'arrêt de croissance des racines et la fixation d'aluminium par les noyaux des cellules.

Récemment, des chercheurs ont mis en évidence une fixation très précoce (30 minutes après traitement) au niveau des noyaux de méristème racinaire du soja sensible Young (*Silva et al., 2000*). Une comparaison réalisée au bout de 72 heures d'exposition montrait que le soja tolérant PI 416937 accumulait moins d'aluminium dans ses noyaux que le soja sensible Young. Comme l'arrêt des divisions cellulaires par le métal ne peut être responsable à lui seul de l'inhibition de croissance racinaire car la division ne participe que de 1 à 2% à l'élongation racinaire (*Kochian, 1995*), les conséquences de la présence d'aluminium dans les noyaux restent encore à découvrir.

1.2.7. LE STRESS OXYDATIF

En 1991, des chercheurs mirent en évidence pour la première fois une peroxydation des lipides due à l'aluminium chez le soja (*Cakmak et Horst, 1991*). Cette peroxydation apparaît seulement après des longs traitements au métal. L'activité des superoxide dismutases et des peroxydases était augmentée alors que celle des catalases était diminuée. Une peroxydation similaire a également été observée chez des cellules de tabac en culture (*Yamamoto et al., 1997*). Récemment, des travaux ont montré que la production d' H_2O_2 dans des racines de blé était détectée 24 heures après avoir exposé les plantes à l'aluminium alors que des symptômes de mort cellulaire étaient observés dès 8 heures d'exposition (*Delisle et al., 2001 ; Champoux, 2002*). Ainsi, la mort cellulaire causée par l'aluminium intervient bien avant la production d' H_2O_2 . Chez le pois, d'autres équipes de scientifiques ont observé que la peroxydation des lipides et le dépôt de callose survenaient après 4 heures d'exposition, bien avant la mort cellulaire apparaissant après 8 heures d'exposition au métal. Ceci suggère que la peroxydation des lipides est un symptôme précoce et qu'elle ferait intervenir d'autres formes oxygénées réactives que l' H_2O_2 (*Yamamoto et al., 2001*). Les auteurs précisent que la peroxydation des lipides pourrait être

impliquée dans la formation de dépôt de callose mais qu'elle n'intervient en aucune manière dans l'inhibition de croissance racinaire. En effet, celle-ci est observée même en présence d'anti-oxydant.

Ces mêmes auteurs ont montré en 2002 (Yamamoto *et al.*, 2002) que la forme oxygénée réactive induite par l'accumulation d'aluminium dans les cellules de tabac serait certainement O_2^- . Ils ont aussi observé que l'accumulation de l'aluminium dans les cellules s'effectue dès l'ajout du métal dans le milieu de culture et qu'elle conduit à une inhibition de la respiration cellulaire, une réduction de la quantité d'ATP et une perte de la capacité à croître en milieu standard. Ces symptômes étaient observables après 12 heures d'exposition sans perte de l'intégrité membranaire qui était conservée durant au moins 24 heures. Le métal étant immédiatement accumulé dans la cellule, les auteurs en concluent que la répression des activités mitochondriales et de la perte de la capacité à croître ne sont que des conséquences tardives de la présence du métal. Les auteurs montrent également le rôle de O_2^- dans la perte de la capacité à croître mais ils précisent que O_2^- n'intervient aucunement dans la perte de l'activité respiratoire. Les auteurs ont observé des phénomènes similaires chez les racines de pois : l'aluminium conduit là aussi à une diminution de la croissance racinaire, de la quantité d'ATP et de la respiration à partir de la 4^{ème} heure d'exposition (Yamamoto *et al.*, 2002). La production d'espèces d'oxygène réactive est détectée après 2 heures d'exposition.

En somme, l'aluminium serait responsable de la production d'espèces d'oxygène réactive mais toutes les formes n'auraient pas le même rôle. L'espèce O_2^- apparaîtrait de façon précoce en même temps que la peroxydation des lipides, les dépôts de callose et la mort cellulaire. Cette forme serait impliquée dans l'arrêt de croissance des racines. La molécule H_2O_2 apparaîtrait de façon beaucoup plus tardive et n'interviendrait pas dans le processus de peroxydation.

1.2.8. GÈNES INDUITS PAR L'ALUMINIUM

Plusieurs gènes sont surexprimés en réponse à l'aluminium chez le blé, le tabac, *Arabidopsis thaliana*, le seigle et la canne à sucre. Ces gènes codent pour des protéines généralement produites lors de stress biotiques ou abiotiques (métaux, carences, blessures, attaques de pathogènes, stress oxydatif). Ces protéines sont de différentes natures : *multidrug resistance* (MDR) *like protein* (Sasaki *et al.*, 2002a), phenylalanine ammonia-lyases (Snowden et Gardner, 1993 ; Hamel *et al.*, 1998) inhibiteurs de protéase (Snowden et Gardner, 1993 ; Richards *et al.*, 1994 ; Richards *et al.*, 1998), *GDP dissociation inhibitor* (Ezaki *et al.*, 1997), metallothioneine-like protein (Snowden et Gardner, 1993), protéines riches en cystéines de fonction inconnue (Snowden et Gardner, 1993 ; Richards *et al.*, 1994), peroxydases (Ezaki *et al.*, 1996 ; Hamel *et al.*, 1998 ; Richards *et al.*, 1998 ; Milla *et al.*, 2002), β -1,3-glucanase (Cruz-Ortega *et al.*, 1997), glutathion S-tranferase (Ezaki *et al.*, 1995 ; Richards *et al.*, 1998), cystéine protéase (Hamel *et al.*, 1998), oxalate oxydase (Hamel *et al.*, 1998), *blue copper-binding protein*, *reticulin: oxygen oxidoreductase*, superoxide dismutase (Richards *et al.*, 1998), des protéines liées à la réponse à l'auxine (Ezaki *et al.*, 1995), des protéines impliquées dans la signalisation cellulaire, régulation d'expression (Watt, 2003), l'élongation et la division cellulaire (Milla *et al.*, 2002), et enfin de nombreuses protéines aux fonctions encore inconnues (Watt, 2003).

Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, l'aluminium induit l'expression de deux gènes, l'un codant pour une *heat shock protein*, Hsp150 et l'autre pour une protéine membranaire de fonction inconnue, Sed1 (Ezaki *et al.*, 1998).

Des équipes de chercheurs ont alors tenté d'estimer la protection potentielle apportée par tous ces gènes induits par l'aluminium. Ils ont donc réalisé différentes stratégies de transgénèse. Ezaki *et al.* ont montré en 1998 que le gène *HSP150*

accordait une certaine tolérance à l'aluminium à la levure mais pas le gène *SEDI*. Cette tolérance serait due à la protection apportée par le gène *HSP150* contre le stress oxydatif plus qu'à une interaction directe de la protéine Hsp150 avec l'ion Al^{3+} . De la même façon, les gènes codant pour une *blue copper binding protein* d'*Arabidopsis thaliana* et pour un *GDP dissociation inhibitor* de tabac ont été surexprimés chez la levure (Ezaki *et al.*, 1999). Ces gènes conféraient une faible tolérance aux levures. Chez *Arabidopsis thaliana*, seuls les gènes codant pour la *blue copper binding protein*, le *GDP dissociation inhibitor*, une glutathion S-tranferase et une peroxydase apportèrent une faible résistance au métal (inférieure à un facteur 1,5 par rapport aux plantes sauvages non-génétiquement modifiées). Les autres gènes comme par exemple *HSP150* ne conféraient aucune tolérance à *Arabidopsis thaliana* (Ezaki *et al.*, 2000).

Ainsi, certains des gènes identifiés comme induits par l'aluminium peuvent conférer une résistance au métal mais cette tolérance reste très faible et est loin des niveaux de tolérance exprimés par certaines variétés végétales sauvages. En fait, ces gènes sont plutôt à rattacher spécifiquement aux processus de toxicité et non de tolérance puisqu'ils semblent faire partie de voies de réponse communes à différents stress et qu'ils sont sur-exprimés indifféremment chez les variétés sensibles et tolérantes (Hamel *et al.*, 1998).

1.3. LA TOLÉRANCE À L'ALUMINIUM

1.3.1. EXPRESSION DE LA TOLÉRANCE

Toutes les plantes ne réagissent pas de la même façon à l'aluminium. Chez les céréales, des variations de sensibilité à l'aluminium sont observées entre les différents genres de plantes. Ainsi, **Aniol** et **Gustafon** ont classé en **1984** le seigle (*Secale cereale* L.) comme la céréale la plus tolérante et l'orge (*Hordeum vulgare*) comme la plus sensible, le blé (*Triticum aestivum* L.) présentant une tolérance intermédiaire :

seigle >> triticale > blé > orge

Cependant, des variations de sensibilité peuvent être aussi observées pour un même genre botanique. En effet, chez le blé par exemple, il est possible de distinguer des variétés tolérantes de variétés sensibles par le fait qu'elles présentent une croissance moins affectée par le métal. Il a été ainsi observé que les variétés tolérantes de blé accumulent environ 8 à 10 fois moins d'aluminium dans les 2 premiers millimètres de leurs apex racinaires que les variétés sensibles (**Rincón et Gonzales, 1992**). Cette aptitude à moins accumuler d'aluminium est souvent retrouvée chez de nombreuses variétés tolérantes de différents genres botaniques. Par exemple, des chercheurs ont montré que le soja tolérant PI 416937 accumule moins d'aluminium dans ses noyaux que le soja sensible Young au bout de 72 heures d'exposition (**Silva et al., 2000**).

Cependant, bien que l'inhibition de croissance racinaire intervienne très tôt aussi bien chez les variétés tolérantes que sensibles (**Llugany et al., 1995**), les deux types de variétés ne vont pas se comporter de la même manière au cours du temps. Des scientifiques ont montré que l'inhibition de croissance racinaire s'accroît avec le temps chez le maïs sensible S1587-17 alors qu'elle restait stable voire qu'elle diminuait chez la variété tolérante Cat100-6 (**Figure 1.6**) (**Boscolo et al., 2003**).

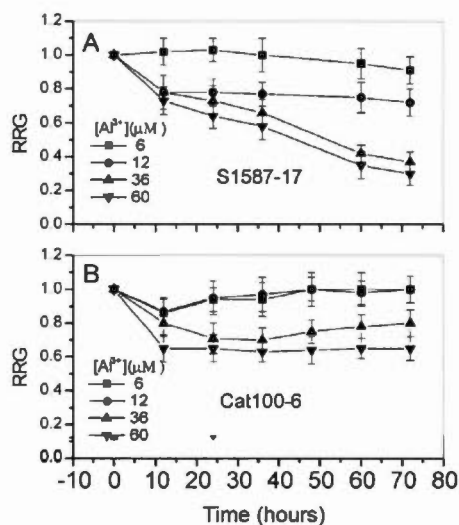


Figure 1.6 : Cinétique d'inhibition par l'ion Al^{3+} de la croissance relative des racines chez le maïs.

Suivi de la croissance racinaire chez la variété sensible S1587-17 (A) et variété tolérante Cat100-6 (B) exposées à différentes concentrations d'aluminium. RRG = croissance moyenne des racines exposées à l'Al / croissance moyenne des racines non exposées (d'après Boscolo *et al.*, 2003).

Les auteurs ont également observé une augmentation de l'activité des peroxydases et des superoxide dismutases chez le maïs sensible S1587-17 alors que ces activités restent stables chez le maïs tolérant Cat100-6. Aucune variation d'activité n'a été observée pour les catalases chez les deux types de maïs. Des variations d'activité enzymatique similaires à celles observées chez le maïs sensible avaient déjà été constatées pour le soja (Cakmak et Horst, 1991). Les chercheurs ont aussi constaté que ces activités enzymatiques n'augmentent qu'après 24 heures d'exposition à l'aluminium. Ceci suggère que le stress oxydatif ne peut être responsable de l'inhibition de croissance racinaire qui apparaît dans leur expériences dès la 12^{ème} heure d'exposition (Boscolo *et al.*, 2003). De plus, ils n'ont observé aucune peroxydation des lipides contrairement à ce qui avait été précédemment décrit par d'autres équipes (Cakmak et Horst, 1991 ; Yamamoto *et al.*, 1997). Toutefois,

les auteurs ont observé une peroxydation des protéines conduisant à la formation de groupements carbonyles, et cela uniquement chez la variété sensible au métal. Ils ont également rapporté une augmentation de la mortalité cellulaire chez la variété sensible par rapport à la variété tolérante après 48 heures d'exposition. Les auteurs remettent ainsi en question l'hypothèse selon laquelle la mort cellulaire serait due à la peroxydation des lipides puisqu'ils ne constatent pas ce phénomène. Ils suggèrent donc l'existence d'autres mécanismes menant à la mort cellulaire ou des divergences de réponses selon les plantes étudiées.

D'autres travaux réalisés chez le blé ont mis en évidence une corrélation étroite entre les seuils de tolérance des plantes et leurs capacités à réduire un colorant, le nitro blue tetrazolium (NBT) (**Maltais et Houde, 2002 ; Maltais, 2002**). Les auteurs ont aussi constaté que la reprise de cette capacité à réduire le NBT chez la variété tolérante Atlas-66 s'effectuait entre la 4^{ème} et la 24^{ème} heure d'exposition au métal, suggérant la mise en jeu de processus inductibles. Les auteurs posèrent l'hypothèse que les processus de résistance à l'aluminium puissent être des mécanismes inductibles comme cela est le cas pour la capacité à réduire le NBT. Chez le blé, ces mécanismes seraient mis en place après la quatrième heure d'exposition au métal.

1.3.2. LE SUPPORT GÉNÉTIQUE DE LA TOLÉRANCE

De nombreux travaux réalisés dans les années 80 et 90 ont visé à identifier les gènes responsables de la tolérance à l'aluminium. Ces travaux étaient essentiellement basés sur des croisements génétiques et des translocations de bras chromosomiques entre différents genres de céréales reconnus pour leurs seuils élevés de tolérance à l'aluminium (**Aniol et Gustafon, 1984 ; Aniol, 1990 ; Berzonsky, 1992 ; Aniol, 1995 ; Ma et al., 2000a**).

Ces différents travaux ont montré que la tolérance à l'aluminium serait un caractère multigénique dominant, héréditaire et porté par le génome nucléaire (**Berzonsky, 1992**). Cependant, mis à part des positions hypothétiques sur des bras chromosomiques le nombre exact de gènes impliqués dans les mécanismes de tolérance était peu clair.

Il a fallu attendre les années 2000 pour voir apparaître certaines évaluations du nombre de gènes par d'autres procédés expérimentaux. Des chercheurs ont ainsi réalisé de nombreux croisements et utilisé un système d'isozymes pour proposer deux loci majeurs, dominants et indépendants responsables de la tolérance chez le seigle, *Alt1* et *Alt3* (**Gallego et al., 1998**). D'autres équipes ont utilisé des marqueurs RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) et des croisements entre le maïs tolérant Cat100-6 et le sensible S1587-17 pour identifier deux loci responsables de la tolérance à l'aluminium chez Cat100-6 (**Sibov et al., 1999**). Chez le riz, des études de *Quantitative Trait Locus* (QTL) basées sur des marqueurs moléculaires ont montré l'implication de 3 loci dans la tolérance au métal (**Ma et al., 2002** ; **Nguyen et al., 2002** ; **Nguyen et al., 2003**). Enfin chez le blé, des travaux de mutagenèse chez la variété sensible Anahuac par irradiation aux rayons gamma ont montré que la tolérance serait portée par un seul gène (**Camargo et al., 2000** ; **Neto et al., 2001**). De tels procédés expérimentaux n'ont jamais été appliqués à la variété tolérante Atlas-66 étudiée au cours de cette thèse. Cependant, des travaux récents confirment l'hypothèse de **Camargo (1981)** selon laquelle au moins deux gènes seraient responsables de la tolérance à l'aluminium chez le blé Atlas-66 (**Tang et al., 2002**).

1.3.3. GÈNES ET PROTÉINES DE TOLÉRANCE

La plupart des études visant à analyser les gènes différentiellement exprimés par l'aluminium ont consisté à effectuer des criblages différentiels entre des populations d'ADNc de plantes exposées et non exposées au métal (Snowden et Gardner, 1993 ; Richards *et al.*, 1994 ; Ezaki *et al.*, 1995 ; Ezaki *et al.*, 1996 ; Ezaki *et al.*, 1997 ; Richards *et al.*, 1998 ; Hamel *et al.*, 1998). Plus récemment, de nouvelles techniques ont été utilisées : banques d'EST (*Expressed Sequence Tag*) (Milla *et al.*, 2002), ARNm "*Differential Display*" (DD) (Sasaki *et al.*, 2002a), et l'Hybridation Suppressive Soustractive (SSH) (Watt, 2003). Cependant, tous ces travaux ont été appliqués entre des populations d'ADNc de plantes stressées et non-stressées à l'aluminium, ce qui explique certainement pourquoi toutes ces études n'ont isolé que des gènes de stress.

Afin d'isoler des gènes de tolérance, d'autres équipes de chercheurs ont aussi réalisé des banques d'expression protéique chez la levure. Ainsi, Delhaize *et al.* (1999) ont montré que le gène d'une phosphatidylserine synthase de blé tolérant conférait une certaine résistance à la levure mais que sa surexpression chez *Arabidopsis thaliana* et le tabac conduisait à des nécroses dramatiques des feuilles. MacDiarmid et Gardner (1998) ont sélectionné de la même façon à partir d'une banque d'ADNc de levure, deux gènes codant pour des transporteurs au magnésium et qui conféraient une tolérance modérée à l'aluminium aux levures transformées.

Les études portant sur les protéines différentiellement exprimées ont apporté des résultats intéressants. Par électrophorèse de protéines, des équipes ont pu identifier trois protéines de 12, 22 et 33 kD qui s'accumulent spécifiquement en présence du métal chez le blé tolérant Atlas-66, trois protéines de 12, 23 et 43,5 kD qui s'accumulent chez le blé tolérant Maringa et enfin deux protéines de 51 kD chez le blé tolérant PT741 (Basu *et al.*, 1994a ; Basu *et al.*, 1994b). Toutes ces protéines

ne s'accumulaient pas chez les différentes variétés sensibles utilisées comme contrôles.

Vers la fin des années 90, ces mêmes auteurs ont montré que les protéines de 51 kD de PT741 et 23 kD de Maringa co-ségréguaient avec le phénotype de tolérance (**Taylor et al., 1997 ; Basu et al., 1999**). La protéine de 23 kD présente la capacité de lier l'aluminium (**Taylor et al., 1997**) alors que les deux protéines de 51 kD sont des homologues à la sous-unité B d'une proton-ATPase vacuolaire et des sous-unités α et β d'une ATP synthase mitochondriale (**Hamilton et al., 2001**). Dans cette dernière étude, **Hamilton** et collaborateurs précisent que ces 2 protéines de 51 kD sont accumulées chez PT741 en présence d'aluminium, que leurs activités sont induites par la présence du métal mais bien que le taux de transcrite semble augmenté de 2,2 fois pour la proton-ATPase vacuolaire, il reste fixe pour l'ATP synthase mitochondriale laissant supposer une régulation de type post-transcriptionnelle. Cependant, les auteurs montrent aussi que l'accumulation de ces deux protéines induites par l'aluminium est spécifique à la variété PT741 et qu'elle n'est pas retrouvée chez les variétés sensibles ni d'ailleurs chez les deux autres variétés tolérantes Atlas-66 et Maringa. Ces derniers résultats suggèrent une expression variétale spécifique et ne permettent donc pas de généraliser quant à l'implication de ces deux protéines dans les mécanismes de tolérance à l'aluminium.

Dernièrement, **Sasaki et al. (2002)** ont présenté au Congrès Annuel 2002 de la société japonaise des physiologistes des plantes (JSPP) un gène candidat pour la résistance au métal et qui coderait peut-être pour un transporteur de malate, *ALMT1*. Ce gène a été isolé par Hybridation Soustractive Suppressive (SSH) entre le blé tolérant ET8 et le blé sensible ES8 exposés à 50 μ M d'aluminium. Il est plus exprimé de façon constitutive chez le blé tolérant ET8 que chez le blé sensible ES8 (**Sasaki et al., 2004**). Sa surexpression chez le riz conduit à un efflux de malate Al-dépendant mais aucune résistance à l'aluminium n'est observée. L'analyse de séquence de ce

gène a montré une différence de six nucléotides (deux acides aminés) entre les variétés tolérantes Atlas-66 et ET8 et les variétés sensibles Scout-66 et ES8. Les variétés ET8 et ES8 correspondent à la huitième génération de plantes issue d'un croisement entre le blé tolérant Carazinho et le blé sensible Egret. Ces deux dernières souches (Carazinho et Egret) différaient pour leur tolérance à l'aluminium par un simple locus, le locus *Alt1* (Delhaize *et al.*, 1993b). Ce locus a été identifié comme étant présent sur le chromosome 4DL (Raman *et al.*, 2005). Enfin, des expériences d'expression de ce gène chez l'ovocyte de *Xenopus* montrèrent une sécrétion préférentielle de malate à celle du citrate et la mise en évidence de la présence d'un domaine de réponse à l'aluminium. Ce gène a ensuite été utilisé pour transformer l'orge et les chercheurs ont démontré que ce gène permettait une sécrétion de malate induite par la présence du métal. De plus, la tolérance au métal acquise par la sur-expression du gène était comparable à celle des variétés tolérantes de blé démontrant l'importance de ce gène dans les mécanismes de tolérance à l'aluminium (Delhaize *et al.*, 2004).

1.3.4. LA SÉCRÉTION D'ACIDES ORGANIQUES : MÉCANISME DE TOLÉRANCE À L'ALUMINIUM SPÉCIFIQUE DU BLÉ

Les mécanismes de tolérance peuvent être classés en deux catégories : des mécanismes d'exclusion visant à maintenir l'aluminium à l'extérieur de la cellule et des mécanismes de détoxification visant à éliminer le métal présent dans la cellule ou du moins dans le symplasme (Kochian, 1995).

Un mécanisme d'exclusion proposé au début des années 90 présente la sécrétion d'acides organiques induite par l'aluminium comme un moyen des plantes tolérantes à séquestrer les ions Al^{3+} à l'extérieur de leur appareil racinaire. Ce mécanisme a été proposé pour la première fois par Miyasaka et collaborateurs (1991). Ces auteurs ont montré une corrélation entre la sécrétion d'acide citrique et le

niveau de tolérance de deux variétés de haricot, l'une tolérante, l'autre sensible à l'aluminium. D'autres corrélations ont par la suite été mises en évidence entre la tolérance à l'aluminium et la sécrétion d'acide citrique chez le maïs (Pellet *et al.*, 1995), d'acide malique chez le blé (Delhaize *et al.*, 1993a ; Ryan *et al.*, 1995a), mais aussi avec la sécrétion d'acide oxalique chez le sarrasin (Ma *et al.*, 1997).

Ces acides organiques excrétés dans le milieu extérieur des racines chélateraient l'aluminium l'empêchant ainsi d'entrer dans les cellules et de provoquer ses effets néfastes. Des quantités équimolaires d'acide citrique et d'aluminium pourraient ainsi neutraliser les ions Al^{3+} , mais il faudrait trois fois plus d'acide oxalique et six à huit fois plus d'acide malique pour inhiber l'action de l'aluminium (Ma, 2000b). Deux modèles sont proposés pour expliquer la sécrétion d'acides organiques (OA) induite par l'aluminium (Figure 1.7).

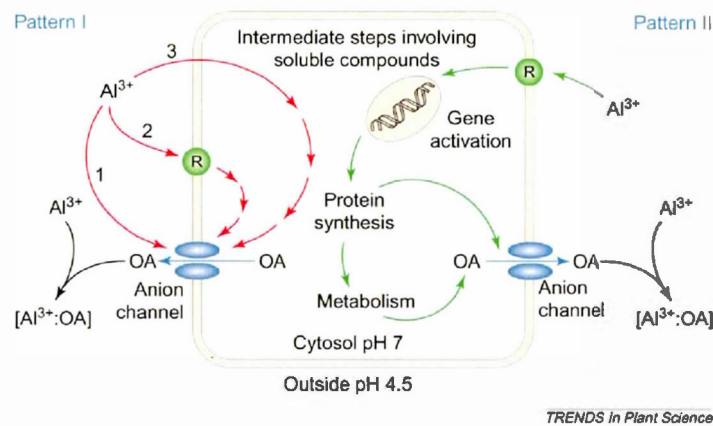


Figure 1.7 : Modèles de la sécrétion d'anions d'acides organiques stimulée par l'aluminium dans les racines de plantes.

OA : acides organiques ; R : récepteur membranaire à l'aluminium (d'après Ma *et al.*, 2001).

Dans le premier modèle (*Pattern I*), l'aluminium activerait un transporteur aux acides organiques (OA) en interagissant directement avec lui sans rentrer dans la

cellule (1), ou pas le biais d'un récepteur (2), ou encore en rentrant dans la cellule par le biais ou non de seconds messagers (3). Dans le deuxième modèle (*Pattern II*), l'aluminium interagirait avec un récepteur membranaire pour activer la transcription des gènes impliqués dans le métabolisme des acides organiques (OA) et leur sécrétion.

Cependant, de nombreux auteurs ont également montré que les corrélations entre la sécrétion d'acides organiques et tolérance n'existaient pas toujours. Ainsi, alors que **Delhaize** et collaborateurs (1993) précisent que la variété tolérante de blé Carazinho présente une sécrétion d'acide malique induite (aucune sécrétion dans un milieu sans Al) par la présence d'aluminium, **Christiansen-Weniger** et collaborateurs (1992) observent que cette variété excréterait beaucoup plus de malate et de succinate que les variétés sensibles et ce dans des conditions d'exposition exemptes d'aluminium. Certains auteurs sont même allés jusqu'à remettre en cause les conclusions des travaux de **Ryan et al., (1995a)** en recalculant l'indice de corrélation entre la sécrétion d'acide malique et la tolérance des blés (**Pellet et al., 1996**)

D'autres auteurs ont montré que deux variétés de taro (*Colocasia esculenta*) ne montraient aucune correspondance entre la quantité d'acide oxalique excrété et le taux d'expression de tolérance puisque la variété sensible sécrétait plus d'acides organiques que la variété tolérante (**Ma et Miyasaka, 1998**). De la même façon, des scientifiques ont observé qu'une variété sensible de fougère excrétrait plus d'acides organiques qu'une variété tolérante (**Wenzl et al., 2001**).

Une étude à grande échelle a été réalisée par **Ishikawa** et collaborateurs (2000). Les auteurs ont étudié la réponse de plusieurs genres et variétés de plantes à l'aluminium et en ont déduit qu'il devait exister des mécanismes responsables de la tolérance au métal autres que la sécrétion d'acides organiques. La pertinence de leurs travaux repose surtout sur le genre *Cassia tora* qui présente une forte inhibition de croissance mais également le taux le plus élevé d'excrétion d'acide citrique en présence de métal parmi toutes les plantes étudiées. Ils ont aussi observé que le riz

(*Oryza sativa* L.) et le sorgho (*Sorghum bicolor* Moench) sécrétaient plus faiblement au contraire des autres plantes, l'acide citrique et malique chez leurs variétés tolérantes que chez leurs variétés sensibles.

Enfin, d'autres auteurs ont observé que chez la variété tolérante de blé Atlas-66, l'aluminium conduisait à une diminution de la toxicité due au cuivre mais pas au lanthane. Les auteurs proposent que la sécrétion d'acides organiques qui accompagne le stress à l'aluminium serait capable de diminuer le stress au cuivre mais pas au lanthane, un ion proche de l'aluminium (**Parker et Pedler, 1998**).

En somme, **Parker et Pedler (1998)** et **Ishikawa *et al.* (2000)** proposent l'existence d'autres mécanismes de tolérance plus performants que la sécrétion d'acides organiques et que cette dernière n'aurait qu'un rôle mineur chez les végétaux supérieurs.

Une controverse est également apparue au sujet des voies de biosynthèse des acides organiques (**Figure 1.8**). **Ryan** et collaborateurs (**1995b**) ont observé la sécrétion de malate chez les blés tolérants. Ils ont aussi observé chez des blés isogéniques tolérants et sensibles, des activités similaires de PEP carboxylase (PEPC) et de malate deshydrogénase (MDH), les deux enzymes considérées comme les plus importantes dans la synthèse de malate. Néanmoins, ces variétés de blé ne présentaient pas le même taux de malate synthétisé *de novo* en présence de 100 μM d'aluminium. D'autres voies de biosynthèse n'utilisant pas la PEPC ou la MDH seraient donc mises en jeu mais leur nature reste à ce jour inconnue.

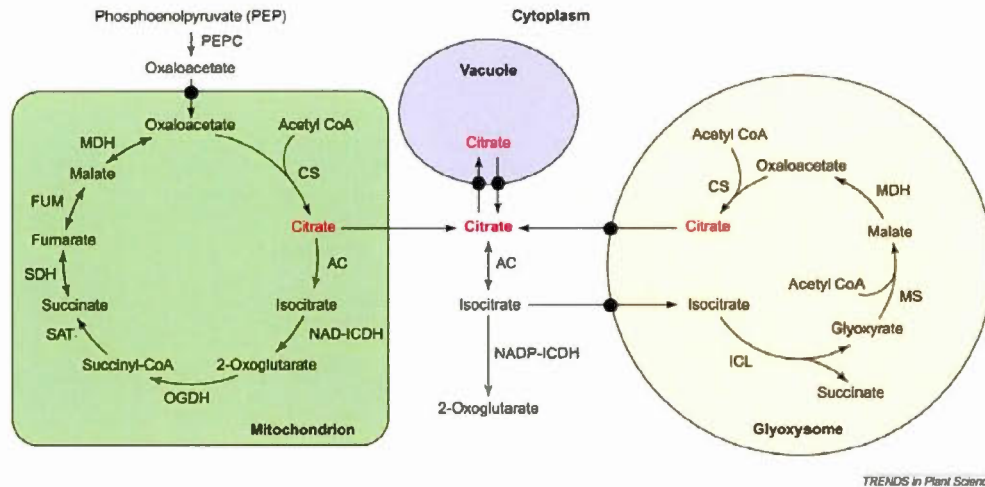


Figure 1.8 : Les enzymes impliquées dans le métabolisme du citrate et du malate. Abréviations : AC, aconitase; CS, citrate synthase; FUM, fumurase, ICDH, isocitrate déhydrogénase; ICL, isocitrate lyase; MDH, malate déhydrogénase; MS, malate synthase; OGDH, 2-oxoglutarate déhydrogénase; PEPC, phosphoenolpyruvate carboxylase; SAT, succinate thiokinase; SDH, succinate déhydrogénase. (d'après Ma *et al.*, 2001).

Des chercheurs ont présenté en 1997 des résultats montrant que la surexpression du gène de la citrate synthase de *Pseudomonas aeruginosa* chez le tabac et la papaye permettaient l'acquisition d'une résistance au métal (De La Fuente *et al.*, 1997). Cependant, ces travaux ont été remis en question par d'autres scientifiques (Delhaize *et al.*, 2001). Ces auteurs ont de nouveau testé les tabacs utilisés par De La Fuente *et al.* (1997) ainsi que de nouveaux tabacs transgéniques exprimant jusqu'à 100 fois plus de citrate synthase que les précédents : ils n'ont pas observé d'accumulation de citrate dans les racines et aucune augmentation de l'efflux de citrate induit par l'aluminium.

D'autres auteurs ont quant à eux surexprimé une citrate synthase mitochondriale de carotte chez *Arabidopsis thaliana* (Koyama *et al.*, 2000). Ils ont observé une corrélation entre l'activité enzymatique détectée et le taux de citrate sécrété ainsi qu'une faible amélioration de croissance sur milieu avec aluminium.

D'autres travaux décrits dans la littérature ont consisté à surexprimer une malate deshydrogénase et une PEP carboxylase de luzerne dans la luzerne (Tesfaye *et al.*, 2001). Les auteurs ont observé une augmentation de l'activité de ces deux enzymes dans les racines, mais seule la surexpression de la malate deshydrogénase permettait d'augmenter la sécrétion d'acides organiques. De plus, une faible amélioration (d'environ un facteur 1,5) de la croissance en présence d'aluminium fût constatée chez les transgéniques surexprimant la malate deshydrogénase. Les auteurs en conclurent que cette amélioration résultait de l'augmentation de la sécrétion d'acides organiques via une élévation de l'activité malate deshydrogénase, en accord avec la théorie selon laquelle la sécrétion d'acides organiques est un mécanisme de tolérance.

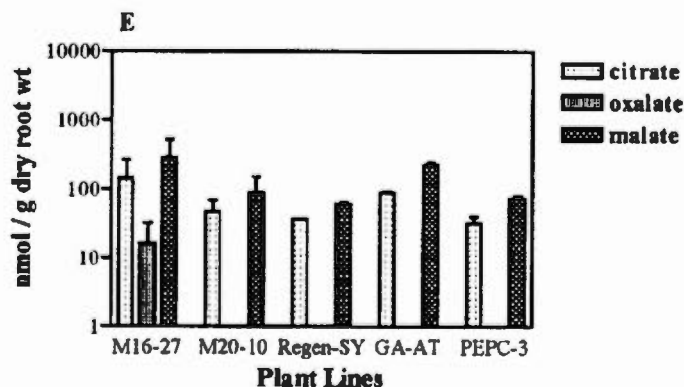


Figure 1.9 : Quantité d'acide organique sécrétée par différentes luzernes transgéniques.

M16-27 et M20-10 : mutants surexprimant la malate deshydrogénase de luzerne. Regen-SY : variété de luzerne sensible à l'aluminium. GA-AT : Variété de luzerne tolérante à l'aluminium. PEPC-3 : mutant surexprimant une PEP carboxylase de luzerne. (d'après la Figure 4-E de Tesfaye *et al.*, 2001).

Cependant, une étude attentive de leur article révèle que les plantes transgéniques surexprimant la PEP carboxylase produisent des quantités d'acides organiques similaires à celles de la variété sensible (Tesfaye *et al.*, 2001 ; Figure 1.9)

mais qu'elle poussent mieux en présence d'aluminium que les plantes transgéniques surexprimant la malate deshydrogénase (Tesfaye *et al.*, 2001 ; Figure 1.10). De plus, elles poussent de manière identique à la variété tolérante GA-AT (d'un facteur 2,5 environ par rapport à la variété sensible). Ces données jettent un sérieux doute sur la validité des conclusions des auteurs. En effet, il semble qu'une augmentation de sécrétion d'acides organiques ne soit pas nécessaire pour obtenir une amélioration de croissance en présence d'aluminium.

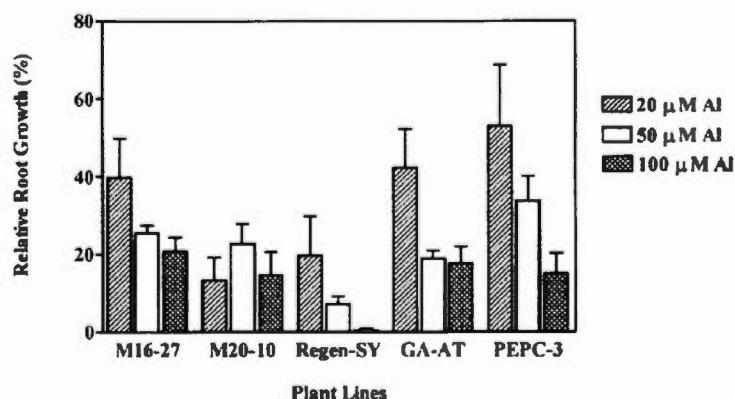


Figure 1.10 : Influence de l'aluminium sur l'élongation racinaire de différentes luzernes transgéniques.

M16-27 et M20-10 : mutants surexprimant la malate deshydrogénase de luzerne. Regen-SY : variété de luzerne sensible à l'aluminium. GA-AT : Variété de luzerne tolérante à l'aluminium. PEPC-3 : mutant surexprimant une PEP carboxylase de luzerne. *Relative root growth* : (élongation racinaire en présence d'aluminium/élongation racinaire sans aluminium) x 100. (d'après la Figure 6 de Tesfaye *et al.*, 2001).

En conclusion, l'implication des acides organiques dans les mécanismes de tolérance à l'aluminium reste donc très controversée si l'ensemble du règne végétal est pris en compte. Cependant, le rôle des acides organiques dans la tolérance à l'aluminium semble très clair pour un nombre restreint de plantes (Ma 2000b ; Ma *et al.*, 2001 ; Ryan *et al.*, 2001). Tout récemment, un consensus parmi les scientifiques

semble apparaître au sujet de la sécrétion d'acide organique comme mécanisme de la tolérance à l'aluminium : il ne serait spécifique que de certains genres tolérants et les molécules sécrétées différeraient selon la plante étudiée. Pour le blé, la sécrétion de malate serait bien le mécanisme majeur de la tolérance à l'aluminium (**Raman *et al.*, 2005**) et mettrait en jeu un transporteur de malate, le gène *ALMT1*, ainsi qu'un régulateur non encore identifié induisant l'activité d'*ALMT1* lorsque le métal est présent dans l'environnement de la plante.

1.3.5. LES HYPERACCUMULATEURS D'ALUMINIUM

Certaines plantes comme le thé ou le sarrasin sont connues pour accumuler l'aluminium dans leurs feuilles âgées pour détoxifier le reste de la plante. Dans le cas du sarrasin, bien que peu de choses soit connu sur les mécanismes d'entrée de l'aluminium, des chercheurs ont mis en évidence l'implication du citrate dans le transport du métal et son accumulation dans les vacuoles des feuilles (**Ma *et al.*, 2001**) (**Figure 1.11**).

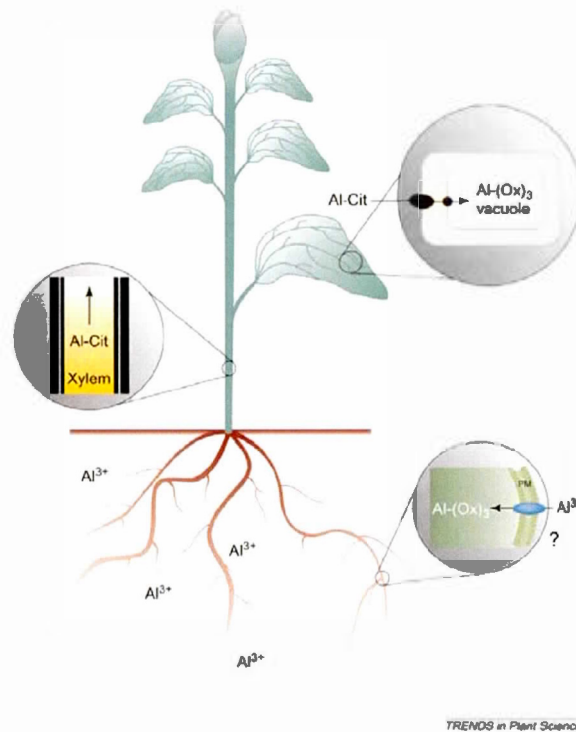


Figure 1.11 : Transport et distribution de l'aluminium chez le sarrasin.

L'aluminium renter dans les racines par un mécanisme inconnu probablement sous la forme Al^{3+} . Une fois passé la membrane plasmique, il est chélaté avec du citrate sous la forme d'un complexe 1:3 Al-oxalate. (ratio 3:1). Lorsque le métal est transporté vers les appareils aériens, il est alors transloqué en complexe Al-citrate. Le métal entre alors dans les feuilles sous complexe Al-oxalate où il sera stocké dans les vacuole. Abbreviations: Cit, citrate; Ox, oxalate; PM, plasma membrane. (d'après Ma *et al.*, 2001).

Un tel mécanisme de transport et de séquestration ressemble à celui observé pour le Nickel avec l'acide aminé histidine comme il a été décrit précédemment (Krämer *et al.*, 1996). Il y aurait donc peut-être des similitudes entre les différents mécanismes de détoxification mis en place par les plantes mais ces mécanismes impliqueraient des molécules bien différentes selon le métal à détoxifier.

Les objectifs de cette thèse étaient d'isoler des gènes associés à la tolérance à l'aluminium chez le blé et le riz, des plantes tolérantes au métal et de forts intérêts agronomiques. Dans ce but, le choix fût d'aller rechercher ces gènes à partir des apex racinaires car ils constituent le site où s'exprime les différences phénotypiques de tolérance. Une fois isolés, l'expression différentielle de ces gènes entre plantes tolérantes et plantes sensibles devait être validée. Leur séquence codante entière devait alors être recherchée pour valider leur apport de tolérance par transgénèse chez la levure, *Arabidopsis thaliana* ou le blé.

CHAPITRE II

MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1. MATÉRIEL VÉGÉTAL

Différentes variétés de blé (*Triticum aestivum* L.) ont été utilisées en raison de leur réponse à l'aluminium et de leur patrimoine génétique : Atlas-66, OK91G103 et OK91G106 qui tolèrent le métal et Fundy, OK91G107 et OK91G108 qui sont sensibles au métal (**Tableau 2.1**) (Carver *et al.*, 1993).

Tableau 2.1 : Les différentes variétés de blé utilisées.

Lignée	Niveau de tolérance à l'aluminium	Parenté
Atlas-66	tolérant	autofécondation
Fundy	sensible	autofécondation
Century	sensible	autofécondation
Chisholm	sensible	autofécondation
OK91G103	tolérant	Atlas-66 x Chisholm
OK91G107	sensible	Atlas-66 x Chisholm
OK91G106	tolérant	Atlas-66 x Century
OK91G108	sensible	Atlas-66 x Century

Les graines de ces différentes variétés ont été mises à germer sous lumière continue pendant 4 jours dans la vermiculite (phyllosilicates d'argile expansé). Les plantules obtenues ont été exposées à différentes concentrations d'aluminium (0, 5 et

50 μM de chlorure d'aluminium) dans une solution de 1 mM de chlorure de calcium à pH4,15 pendant 17 heures pour les expériences d'Hybridation Suppressive Soustractive et Banques GeneRacer ou pendant 27 heures pour l'évaluation des tolérances. Après une évaluation de l'inhibition de la croissance racinaire, les 5 premiers millimètres de chacune des racines des graines ont été prélevés (environ 3 racines par plantules). Les racines correspondant aux mêmes conditions expérimentales (variété et concentration d'aluminium utilisées) ont été réunies dans un tube puis congelées à -80°C . Les ARN totaux ont par la suite été extraits de ces échantillons.

2.2. MATÉRIEL MICROBIOLOGIQUE

La souche d'*Escherichia coli* XL1 blue (recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZ Δ M15 Tn10 (Tetr)], STRATAGENE) et les vecteurs pGEM[®]-T et pGEM[®]-T_{easy} (PROMEGA, **Figure 2.1**) ont été utilisés pour effectuer les clonages de routine et pour la réalisation des deux premières banques SSH. Pour les autres banques SSH et les banques de protéines utilisant les systèmes Gateway d'INVITROGEN, les bactéries ElectroMAX DH10B (F- *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) ϕ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *recA1* *endA1* *araD139* Δ (*ara, leu*)7697 *galU galK* λ - *rpsL nupG*, INVITROGEN) ont été utilisées en raison de leur forte efficacité de transformation par la technique d'électroporation. Le plasmide pGEM[®]-T possède entre autres le gène de résistance à l'ampicilline et la région codant pour le peptide α de la β -galactosidase. La sélection des bactéries transformées s'est faite en présence d'ampicilline (150 $\mu\text{g/ml}$), de X-gal (50 $\mu\text{g/ml}$) et d'IPTG (20 $\mu\text{g/ml}$). La souche de levure *Saccharomyces cerevisiae* INVSc1 (Mat alpha *his3-delta1 leu2 trp1-289 ura3-52*, INVITROGEN) a été utilisée pour l'expression des banques de protéines.

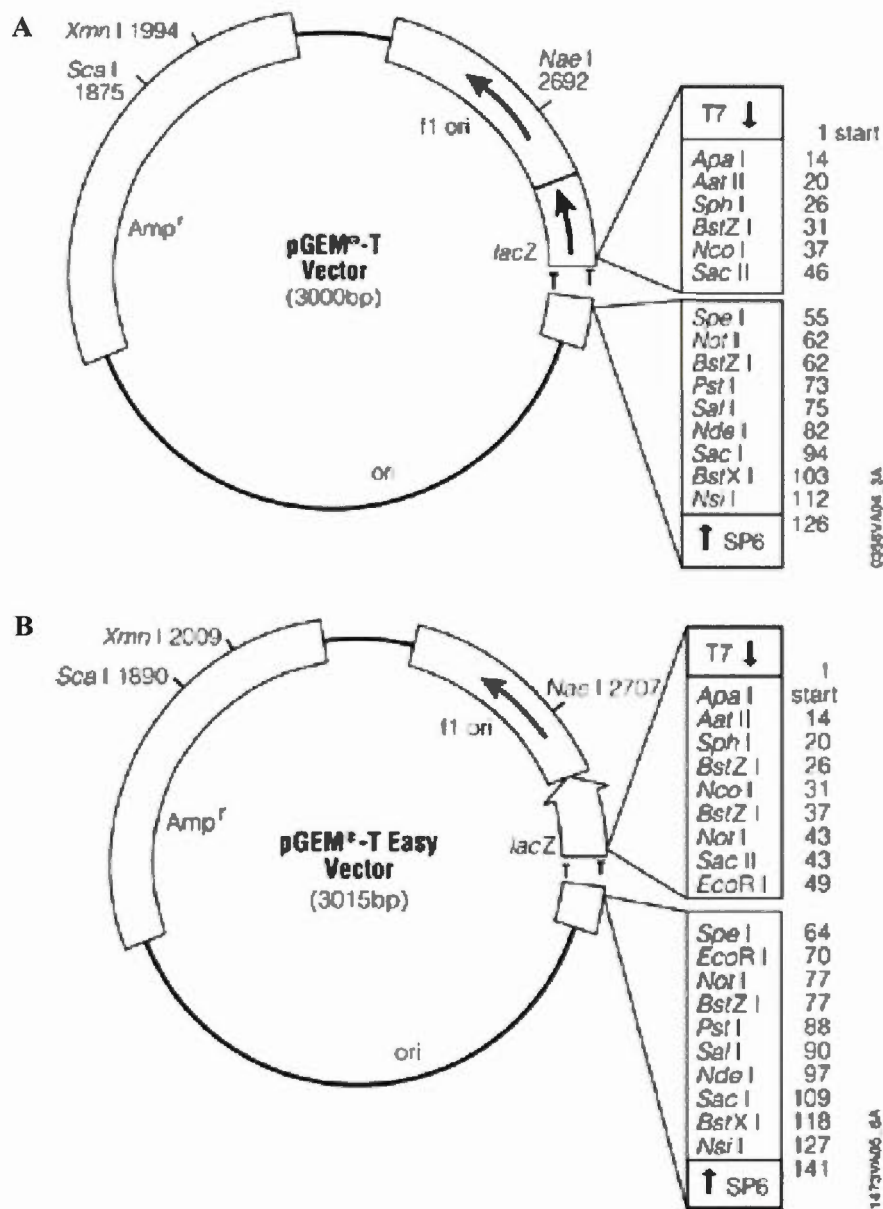


Figure 2.1 : Carte des plasmides pGEM[®]-T et pGEM[®]-T easy de PROMEGA.
 A : carte du vecteur pGEM[®]-T. B : carte du vecteur pGEM[®]-T easy.

2.3. EXTRACTION D'ARN ET TRAITEMENT À LA DNASE RQ1

Deux protocoles d'extraction d'ARN et de traitement à la DNase RNase-free RQ1 (PROMEGA) ont été utilisés : le premier (i) a permis de réaliser les 2 premières banques SSH et les premiers échantillons utilisés pour les analyses par *northern blot* ; le second protocole (ii) a permis de construire les autres banques SSH et les échantillons utilisés pour les analyses de Transcription Inverse PCR (RT-PCR) et de PCR en temps réel (*Real Time* PCR ou *quantitative* RT-PCR (qRT-PCR)).

(i) Le premier protocole d'extraction d'ARN utilisé est dérivé de celui décrit par **Puissant et Houdeline (1990)**. Au cours des différentes expérimentations utilisant les ARN, toutes les solutions aqueuses sont réalisées en utilisant de l'eau ultra pure "MilliQ" (MILLIPORE), filtrée sur 0,2 μm , autoclavée deux fois consécutives. Cette eau est supposée ainsi être dépourvue d'ARNases. Les solutions fabriquées sont aussi autoclavées quand cela est possible. Pour extraire les ARN, un gramme de tissus est broyé dans l'azote liquide jusqu'à l'obtention d'une fine poudre. La poudre est transférée dans 5 ml de GT-Buffer (guanidine thiocyanate 4 M ; Na citrate 25 mM ; sarkosyl 0,5 % ; β -mercaptoethanol 0,1 M). Un volume de 0,3 ml d'acétate de sodium 3 M pH5,5 est ajouté au broyat et agité avec un vortex. Cinq millilitres de phénol saturé en Tris (pH8,8) et 1 ml de chloroforme sont ajoutés aux tubes et l'ensemble est agité avec un vortex. A ce stade, une centrifugation de 15 min à 6 000 g à 4°C est réalisée. La phase aqueuse est prélevée et 5 ml d'isopropanol froid y sont ajoutés. Après agitation, les tubes sont placés à -20°C pendant 1 heure. Une nouvelle centrifugation de 30 min à 6 000 g à 4°C est réalisée. Cinq cent microlitres d'une solution Tris-EDTA-SDS (Tris 10 mM pH7,5 ; SDS 0,5% ; EDTA 1 mM) sont ajoutés aux culots et l'ensemble est transvasé dans des tubes de 1,5 ml. L'opération est renouvelée avec 250 μl de cette même solution pour récupérer les traces restantes. Les tubes sont ensuite placés à 65°C pendant 10 min. L'ensemble est ensuite agité au vortex jusqu'à dissolution complète du culot. Un volume de 500 μl de phénol saturé

en Tris (pH8,8) est ajouté et les tubes sont agités puis centrifugés 5 min à 16 300 g. La phase aqueuse est prélevée et 500 µl de chloroforme y sont ajoutés. Les tubes sont agités et centrifugés 5 min à 16 300 g. La phase aqueuse est prélevée et subit à nouveau le même traitement précédent avec 500 µl de chloroforme. Enfin, 70 µl d'acétate de sodium 3 M pH5,5 et 1 ml d'isopropanol sont ajoutés aux surnageants et les tubes sont placés à -20°C durant 1 heure. Les tubes sont centrifugés pendant 15 min à 16 300 g. Les culots sont lavés avec 500 µl d'éthanol 70% froid puis centrifugés 5 min à 16 300 g. Les culots sont ensuite séchés et resuspendus dans 100 µl d'eau. Les tubes sont ensuite conservés à -80°C. Douze microgrammes d'ARN sont dilués dans un volume final de 33 µl avec de l'eau stérile. Cinq microlitres de tampon DNase RQ1 10X (Tris-HCl pH8 400 mM, MgSO₄ 100mM, CaCl₂ 10 mM), 5 µl de Dithiothréitol (DTT) 10 mM, 2 µl de RNA Guard *Ribonuclease Inhibitor* (AMERSHAM BIOSCIENCES) et 5 unités d'enzyme RQ1 RNase-free DNase (PROMEGA) sont ajoutés. L'ensemble est incubé 1 heure à 37°C. Les volumes de 50 µl d'eau et 100 µl de chloroforme sont ajoutés. L'ensemble est mélangé avec un vortex puis centrifugé 5 min à 16 300 g. La phase aqueuse est récupérée. Dix microlitres d'acétate de sodium 3 M pH5,5 et 250 µl d'éthanol 95% y sont ajoutés. Les tubes sont centrifugés 15 min à 16 300 g. Les culots sont lavés avec de l'éthanol 70%, centrifugés 10 min à 16 300 g et séché à l'air libre. Ils sont repris dans 10 µl d'eau, ce qui correspond à une concentration finale d'environ 1 µg/µl d'ARN.

(ii) Le deuxième protocole d'extraction utilise le TRIzol Reagent d'INVITROGEN selon le protocole décrit par le fournisseur en incluant l'étape optionnelle de la centrifugation après broyage du matériel biologique. Les ARN sont alors traités immédiatement à la DNase de PROMEGA : 5 U RQ1, 10 mM Dithiothréitol, 45 U RNA Guard (AMERSHAM BIOSCIENCES), 20 min à 37°C. Un volume de chloroforme est ensuite ajouté et après centrifugation, les ARN contenus dans la phase aqueuse sont précipités avec 1/10 de volume d'Acétate de Sodium 3 M pH5,5 et 2,5 volume d'isopropanol froid. Les tubes sont centrifugés pendant 15 min à

16 300 g. Les culots sont lavés avec 500 µl d'éthanol 70% froid puis centrifugés 5 min à 16 300 g. Les culots sont ensuite séchés et resuspendus dans 200 µl d'eau.

2.4. QUANTIFICATION DES ARN

Les ARN ont été généralement quantifiés par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 260 nm (une densité optique (DO) de 1 correspondant à 40 µg/ml d'ARN). Pour les expériences de RT-PCR, les concentrations d'ARN ont été réajustées après passage sur gel à l'aide du logiciel QuantityOne de BIO-RAD. Pour les expériences de PCR en temps réel, les ARN ont été de nouveau dosés à l'aide du RiboGreen Kit (MOLECULAR PROBE) selon les conditions du fournisseur.

2.5. HYBRIDATION SOUSTRACTIVE SUPPRESSIVE

L'Hybridation Soustractive Suppressive (SSH) a été mise au point par **Diatchenko et collaborateurs (1996)**. Elle découle de la technique dite de *Representational Difference Analysis* (RDA) (**Lisitsyn et al., 1993**).

L'objectif théorique de la SSH est d'isoler les ARNm présents dans une population d'ARNm donnée appelée *tester* mais qui ne sont pas présents dans une autre population d'ARNm, appelée *driver* (**Figure 2.2**). Ainsi, la SSH est censée isoler les ARNm correspondant à des gènes exprimés de façon spécifique dans la population *tester* et qui ne sont pas exprimés dans la population *driver*. De manière simpliste, la SSH procède à une "soustraction" physique de molécules pour ne conserver que celles qui sont spécifiques de la population nommée *tester*.

Les ARN étant des molécules très fragiles, la technique SSH n'utilise pas directement les populations d'ARNm *tester* et *driver* pour comparer l'expression des gènes mais les ADNc issus de ces deux populations. Les ADNc sont des molécules

doubles brins stables qui se prêtent plus facilement aux manipulations de biologie moléculaire.

La première étape du protocole décrit par les auteurs de la SSH consiste à uniformiser en taille les populations d'ADNc *tester* et *driver* par une digestion *Rsa* I, une enzyme de restriction qui a une fréquence de coupure toutes les 256 paires de base. Cette enzyme reconnaît le site de coupure GT[▼]AC. Ainsi, après digestion, les populations d'ADNc *tester* et *driver* vont avoir une taille moyenne de 256 nucléotides. Par la suite, la population *tester* est scindée en deux sous-populations. L'une est liguée à l'adaptateur 1 tandis que l'autre est liguée à l'adaptateur 2. Les ADNc *driver* ne sont ligués quant à eux à aucun adaptateur (haut de la **Figure 2.2**).

Une première hybridation des deux sous-populations d'ADNc *tester* contre la population d'ADNc *driver* est effectuée en présence d'un excès d'ADNc *driver*. Cette première hybridation est réalisée en dénaturant par la chaleur les molécules d'ADNc puis en procédant à une renaturation par une diminution de la température. Consécutivement à cette hybridation, différentes molécules peuvent être obtenues :

- (i) des molécules mono-brin d'ADNc *tester* n'ayant pas retrouvé de partenaire (molécule "a")
- (ii) des molécules *tester* ayant retrouvé un partenaire *tester* (molécule "b")
- (iii) des molécules *tester* ayant retrouvé un partenaire *driver* (molécule "c")
- (iv) et enfin des molécules de *driver* n'ayant pas trouvé de partenaire ou un partenaire *driver* (molécules "d")

Une seconde étape d'hybridation est ensuite réalisée. Durant cette deuxième hybridation, les molécules d'ADN précédentes ne sont pas dénaturées. L'hybridation est réalisée en mélangeant les molécules obtenues précédemment à partir des deux sous-populations d'ADNc *tester* (l'une liguée à l'adaptateur 1, l'autre liguée à l'adaptateur 2) avec un nouveau excès d'ADNc *driver*. Après cette deuxième étape d'hybridation, les précédentes molécules "a", "b", "c", "d" sont conservées mais une nouvelle molécule peut être obtenue. Elle résulte de l'hybridation d'un brin d'ADNc

tester ligué à l'adaptateur 1 avec un brin d'ADNc *tester* ligué à l'adaptateur 2 (molécule "e").

Après remplissage des extrémités 3' à l'aide d'une ADN polymérase (synthèse du brin complémentaire des adaptateurs), seules les molécules du type "e" pourront être amplifiées de façon exponentielle par la technique PCR. Une première amplification utilise une amorce commune aux deux types d'adaptateurs. Cette étape sert à pré-amplifier les molécules double-brin. La formation de structures en épingle à cheveux pour les molécules de type "b" bloque l'amplification des molécules d'ADNc *tester* ayant la même séquence d'adaptateur aux extrémités 5' et 3'. Cet événement de formation d'épingle à cheveux constitue le procédé de Suppression PCR mis aux points par les scientifiques auteurs de la SSH pour bloquer les amplifications non-désirées. C'est ce procédé technologique qui a été breveté par les laboratoires CLONTECH ainsi que le protocole général de SSH. Cette première amplification PCR enrichit donc les amplifiats en molécules possédant des séquences d'adaptateurs différentes en 3' et 5'. Par la suite, un second jeu de deux amorces spécifiques des adaptateurs 1 et 2 est utilisé servant à réaliser une amplification PCR nichée (*nested-PCR*).

Le procédé complexe de la SSH permet donc d'obtenir des fragments d'ADN amplifiés par PCR, d'une taille relative de 256 paires de base correspondant à des ARNm spécifiques de la population d'ARNm *tester* initiale lorsque celle-ci est comparée à la population d'ARNm appelée *driver*.

Les sections suivantes précisent en détail le procédé expérimental du protocole standard de la SSH ainsi que des protocoles mis au point au cours de cette thèse.

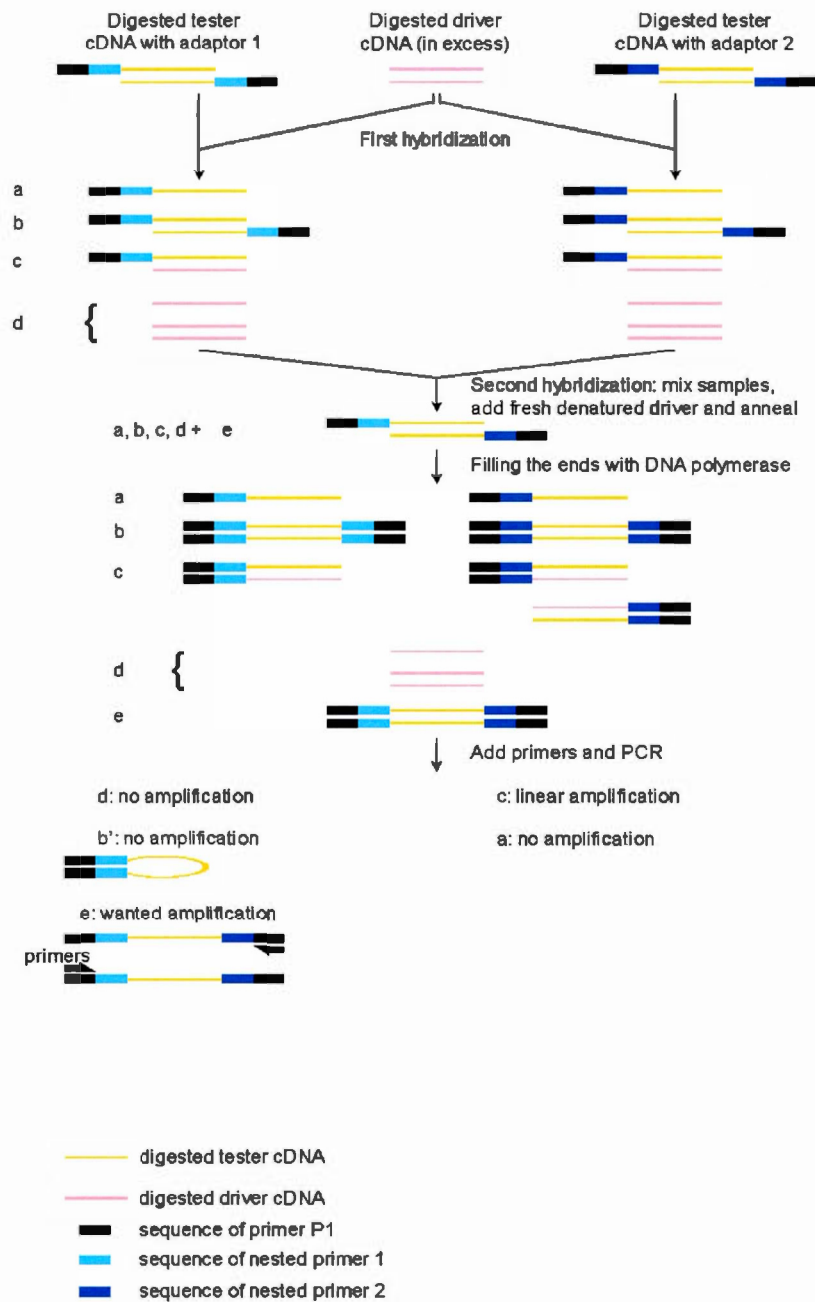


Figure 2.2 : Schéma du protocole de SSH décrit par Diatchenko *et al.* (1996).
(description détaillée de la technique SSH à la section 2.5)

2.5.1. CHROMATOGRAPHIE D'ARN POLY A⁺

Le protocole de chromatographie d'ARN messagers (ARNm) sur colonne d'oligo-dT utilisé est dérivé de celui décrit par **Aviv et Leder (1972)**. Les colonnes sont réalisées à partir de 10 mg d'oligo-dT type 7 de PHARMACIA BIOTECH transférés grâce à des volumes de NaOH 0,1 M dans un support avec filtre. Les support des colonnes sont ensuite placés dans des tubes de 1,5 ml. Les colonnes d'oligo-dT ainsi obtenues sont resuspendues avec 500 µl de NaOH 0,1 M puis centrifugées 5 min à 16 300 g. Les filtrats ne sont pas conservés. Ce lavage à la soude est répété 2 fois. De la même façon suivent 3 lavages avec 500 µl d'eau et 3 lavages avec 500 µl de *Loading Buffer* 1X (Tris-HCl pH8,8 20 mM ; NaCl 0,5 M ; Sodium N-Lauryl Sarcosinate 0,1 %).

Les ARN dissous dans l'eau sont dénaturés par un traitement de 10 min à 65°C et placés ensuite dans la glace. Un volume de *Loading Buffer* 2X est ajouté aux ARN afin d'obtenir une solution à 1X d'environ 500 µg/ml. La solution d'ARN 1X ainsi obtenue est appliquée par volume de 500 µl sur la colonne d'oligo-dT en centrifugeant à chaque fois à 350 g pendant 10 à 30 min. Les éluats obtenus ne sont pas conservés. La colonne est ensuite lavée 4 fois avec 500 µl de *Loading Buffer* 1X par centrifugation à 350 g pendant 10 à 30 min. Les ARN poly A⁺ sont élués par 3 volumes de 500 µl de *Elution Buffer* (Tris-HCl pH8,8 10 mM ; EDTA 1 mM ; SDS 0,05%) préchauffés à 65°C dans des conditions de centrifugation à 16 300 g pendant 1 min.

Les 3 éluats ainsi obtenus sont combinés dans un tube de 15 ml. Des volumes de 150 µl d'acétate de sodium 3 M, pH5,5 et de 4 ml d'isopropanol froid y sont ajoutés. Les tubes sont placés 1 heure à -20°C puis centrifugés 30 min à 6 000 g. Les culots sont lavés avec 4 ml d'éthanol 70% et centrifugés à 6 000 g durant 30 min,

séchés et resuspendus dans 200 μ l d'eau. La quantité d'ARN poly A⁺ est alors estimée par spectrophotométrie UV.

2.5.2. DRIVER ET TESTER

Le choix des populations d'ADNc à utiliser comme *tester* et *driver* a été délicat. Comme il a été mentionné précédemment, l'ensemble des études basées sur l'expression différentielle de gènes due à l'aluminium s'est fait en comparant les profils d'expression de plantes exposées au métal et ceux de ces mêmes plantes non exposées à l'aluminium (Snowden et Gardner, 1993 ; Richards *et al.*, 1994 ; Ezaki *et al.*, 1995 ; Ezaki *et al.*, 1996 ; Ezaki *et al.*, 1997 ; Richards *et al.*, 1998 ; Hamel *et al.*, 1998 ; Milla *et al.*, 2002 ; Sasaki *et al.*, 2002a ; Watt, 2003 ; Chapitre 1: 1.3.3). Ces travaux n'ont permis à ce jour que d'isoler des gènes impliqués dans les mécanismes de phytotoxicité.

L'objectif principal de ce doctorat était d'identifier des gènes spécifiques de la tolérance à l'aluminium. Ainsi, au lieu de comparer les profils d'une même plante dans des milieux avec et sans aluminium, le choix a été fait de comparer les profils d'expression de plantes tolérantes et de plantes sensibles au métal à des états de stress identiques. En effet, les variétés tolérantes acceptent généralement des concentrations supérieures en aluminium à celles des variétés sensibles pour présenter des états physiologiques identiques. Les variétés tolérantes doivent donc avoir mis en place des mécanismes de résistance pour tolérer de telles concentrations. Le genre botanique choisi fût le blé pour son intérêt agronomique, les nombreuses études faites sur les phénomènes de tolérance au métal et les variétés déjà disponibles au sein du laboratoire. Les variétés sensibles ont été exposées à 5 μ M d'aluminium et les variétés tolérantes à 50 μ M. A ces concentrations, les deux types de variétés sont dans des conditions de stress similaires (Hamel *et al.*, 1998) mais continuent à pousser.

Ainsi les plantes tolérantes de blé possèdent donc des mécanismes leur permettant de croître dans des concentrations d'aluminium 10 fois supérieures à celles acceptées par les variétés sensibles. Comme la tolérance semble un phénomène inductible (Maltais, 2002), cette capacité à tolérer des fortes concentrations d'aluminium pourrait être liée à l'induction ou la surexpression de certains gènes.

L'utilisation de la technique SSH avec les ARNm des plantes tolérantes et sensibles dans des conditions d'exposition à l'aluminium conduisant à 50% d'inhibition de croissance racinaire représentait donc une alternative d'isoler ces gènes induits ou surexprimés par le métal.

Les différences phénotypiques s'exprimant au niveau de l'apex racinaire, cible initiale de l'aluminium (Kollmeier *et al.*, 2000 ; Chapitre 1 : 1.2.2), l'étude de l'expression différentielle des gènes a ainsi été concentrée sur les apex des plantes. La technique de SSH a donc été appliquée entre les ADNc d'apex racinaires de plantes tolérantes et sensibles exposées à des doses d'aluminium conduisant à 50% d'inhibition de la croissance racinaire.

Plus précisément, les banques SSH ont été réalisées à partir des ADNc de deux variétés de blé : les ADNc de la variété tolérante Atlas-66 exposée à 50 μM (utilisés comme *tester*) et les ADNc de la variété sensible Fundy exposée à 5 μM d'Al (utilisés comme *driver*).

2.5.3. LES DIFFÉRENTS PROTOCOLES

La SSH a été réalisée à l'aide du kit PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit de CLONTECH selon le protocole standard décrit par le fournisseur et selon différentes modifications décrites dans les sections suivantes. Les raisons et les connaissances

théoriques liées à ces modifications sont quant à elles décrites dans la discussion (**Chapitre 4 : 4.2**).

Cinq banques SSH ont été réalisées comme décrit dans la **Figure 2.3** suivante. En rouge sont mises en valeur les modifications apportées au cours de la réalisation des diverses banques.

Deux séries de synthèses d'ADNc de *tester* et *driver* ont été réalisées. La première série a été utilisée pour les banques 1 et 2, la deuxième série pour les banques 3, 4 et 5.

Les banques 1 et 3 ont suivi le protocole SSH standard mais elles sont issues de deux séries d'extraction d'ARN poly A⁺ et de synthèses d'ADNc *driver* et *tester* distinctes. La banque 3 a servi de référence pour démontrer une efficacité accrue apportée par les protocoles modifiés des banques 4 et 5 comparativement au protocole standard. Ce fût une banque contrôle pour observer si la non-digestion par l'enzyme *Rsa I* des ADNc *driver* et l'utilisation d'une ADN polymérase non-correctrice pouvaient constituer une amélioration technique. Dans un souci de limiter les variations expérimentales, les ADNc correspondant aux *drivers* digérés et non-digéré par l'enzyme *Rsa I* des banques 3, 4 et 5 proviennent de la même réaction de synthèse. De plus, les ADNc *driver* non-digérés ont été traités selon le même protocole expérimental que les ADNc *driver* digérés à l'exception que l'enzyme *Rsa I* et son tampon ont été remplacés par de l'eau.

La banque 2 diffère de la banque 1 par l'ajout d'ARN de *driver* lors de l'étape de PCR. La banque 2 fût un test préliminaire pour observer une amélioration apportée par l'ajout d'ARN *driver* lors des PCR SSH.

La banque 4 diffère de la banque 3 par l'utilisation des *driver* non-digéré et une ADN polymérase non correctrice pour les réactions PCR. L'amélioration apportée par ces deux modifications sera évaluée en comparant les banques 3 et 4, la banque 3 servant de référence.

Enfin la banque 5 diffère de la banque 4 par l'ajout d'ARN *driver* lors des étapes de PCR. Cette dernière banque est une combinaison des améliorations utilisées

pour la banque 2 et celles utilisées pour la banque 4. La banque 3 servira de référence pour évaluer la qualité de cette cinquième banque.

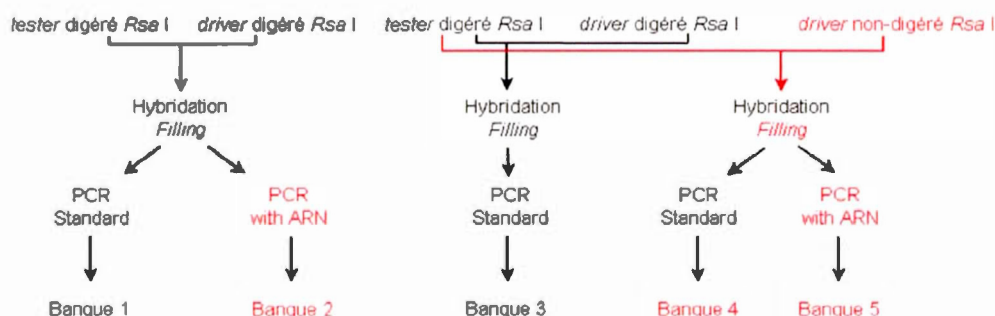


Figure 2.3 : Variation de protocoles entre les cinq banques SSH.

En rouge : modifications apportées au protocole standard SSH au cours de la réalisation des diverses banques SSH.

Afin de ne pas alourdir le texte, les précisions techniques qui vont être décrites dans les sections suivantes ne vont souvent être expliquées que pour la réalisation des banques 3, 4 et 5. En effet, les protocoles suivis pour les banques 1 et 2 sont repris dans la construction des banques 3 à 5.

2.5.4. SYNTHÈSE DU PREMIER BRIN D'ADNC

La synthèse du premier brin d'ADNc a été réalisée à partir de 2 µg d'ARN poly A⁺ pour la variété tolérante Atlas-66 et 4 µg d'ARN poly A⁺ pour la variété sensible Fundy. La quantité d'ARN poly A⁺ de Fundy (ARN poly A⁺ *driver*) a été doublé pour synthétiser en une seule fois suffisamment d'ADNc pour les banques 4 et 5. Ainsi, pour les ARN poly A⁺ *driver* Fundy, les quantités de réactifs décrits dans les sections ci-dessous ont été doublées pour utiliser 4 µg d'ARN poly A⁺ et non pas 2.

A 2 µg d'ARN poly A⁺ sont ajoutés 10 pmol de *cDNA Synthesis Primer*. Cette amorce possède un site de restriction *Hind* III, un site de restriction *Rsa* I et une séquence poly-dT suivie de 2 bases aléatoires, la première ne pouvant être une thymine (**Tableau 2.2**). Le mélange ARN poly A⁺ et amorce poly-dT est incubé 2 min à 70°C afin de dénaturer les ARN puis placé 2 min dans la glace. Du tampon *First-Strand Buffer* est ensuite ajouté (Tris-HCl pH8,5 50 mM ; MgCl₂ 8 mM ; KCl 30 mM ; DTT 1mM) ainsi que des dNTP à une concentration finale de 1 mM et 20 unités d'enzyme *Reverse Transcriptase d'Avian Myeloblastosis Virus* (AMV). Après agitation, le mélange réactionnel est incubé 1,5 heures à 42°C. La réaction de synthèse est arrêtée en plaçant les tubes dans la glace et la synthèse du deuxième brin d'ADNc est aussitôt réalisée.

Tableau 2.2 : Séquence nucléotidique de l'amorce poly-dT *cDNA Synthesis Primer* .

Amorce	Séquence
<i>cDNA Synthesis Primer</i>	5' TTTTGTACAAGCTT ₃₀ N ₁ N 3'

2.5.5. SYNTHÈSE DU DEUXIÈME BRIN D'ADNc

Pour réaliser la synthèse du deuxième brin d'ADNc, le tampon *Second-Strand Buffer* (KCl 100 mM ; ammonium sulfate 10 mM ; MgCl₂ 5 mM ; β-NAD 0,15 mM ; Tris-HCl pH7,5 20 mM ; BSA 0,05 mg/ml) est ajouté au milieu réactionnel précédent ainsi que des dNTP à une concentration finale de 0,2 mM et le *Second-Strand Enzyme Cocktail* (DNA polymérase I 24 unités ; RNase H 1 unité ; *E. coli* DNA ligase 4,8 unités). Les tubes sont agités et incubés 2 heures à 16°C. Six unités de T4 DNA Polymérase sont ajoutées aux tubes et l'ensemble est agité puis placé 30 min à 16°C. Cette deuxième étape de synthèse est stoppée par l'ajout de 4 µl de 20X *EDTA/Glycogen Mix* (EDTA 200 mM ; glycogène 1 mg/ml). Cinquante microlitres

de phénol Tris saturé pH7,5 et 50 µl de chloroforme sont ajoutés. Les tubes sont agités au vortex et centrifugés à 16 300 g pendant 10 min à température ambiante. Les phases aqueuses sont prélevées et 100 µl de chloroforme y sont ajoutés. Les tubes sont de nouveau agités et une nouvelle centrifugation à 16 300 g est effectuée. Les phases aqueuses sont de nouveau prélevées. Après l'ajout de 40 µl d'acétate d'ammonium 4 M et 300 µl d'éthanol 95%, les tubes sont immédiatement centrifugés 20 min à 16 300 g à température ambiante. Les culots sont ensuite lavés avec 500 µl d'éthanol 70%. Après une nouvelle centrifugation de 10 min à 16 300 g, les culots sont séchés 10 min à l'air libre. Ils sont resuspendus dans 50 µl d'eau. Six microlitres sont prélevés et conservés à -20°C pour être observés par électrophorèse en gel d'agarose. Le reste est utilisé pour continuer le protocole SSH.

Il est à noter que l'utilisation de 4 µg d'ARN poly A⁺ de blé Fundy exposés à 5 µM d'aluminium a permis d'obtenir suffisamment d'ADNc *driver* pour réaliser deux banques, les banques 4 et 5.

2.5.6. TRAITEMENTS DES ADNc DOUBLE-BRIN

Le lot d'ADNc issu de la variété Atlas-66 a été digéré par l'enzyme *Rsa* I selon le protocole décrit ci-dessous. Les ADNc issu de la variété Fundy ont été séparés en 2 lots : un lot digéré par l'enzyme *Rsa* I selon le même protocole utilisé pour les ADNc d'Atlas-66, un deuxième lot non-digéré où l'enzyme *Rsa* I et le tampon enzymatique ont été remplacés par de l'eau. En dehors de ces différences, les incubations et les précipitations ont été réalisées de la même façon pour les 3 lots d'ADNc.

Les ADNc double-brin sont digérés à 37°C pendant 1,5 heures en utilisant 15 unités de *Rsa* I dans du tampon *Rsa I Restriction Buffer* (Bis Tris Propane-HCl pH7 10 mM ; MgCl₂ 10 mM ; DTT 0,1 mM). Cinq microlitres de réaction sont conservés pour estimer l'efficacité de la digestion par électrophorèse sur gel d'agarose. La

réaction est stoppée par l'ajout de 2,5 μl 20X *EDTA/Glycogen Mix*. Vingt-cinq microlitres de phénol et 25 μl de chloroforme sont ajoutés aux réactions et après agitation les tubes sont centrifugés 10 min 16 300 g. La phase aqueuse est prélevée, 50 μl de chloroforme sont ajoutés et l'ensemble est agité. Une nouvelle centrifugation à 16 300 g durant 10 min est effectuée et la phase aqueuse est de nouveau prélevée. Les ADN sont précipités à l'aide de 25 μl d'acétate d'ammonium 3 M et 187,5 μl d'éthanol 95 % sous 16 300 g pendant 20 minutes. Les culots sont lavés avec 200 μl d'éthanol 70 %, centrifugés à 16 300 g durant 5 minutes, puis séchés à l'air libre 10 minutes. Ils sont finalement resuspendus dans 5,5 μl d'eau. Les tubes sont conservés à -20°C .

2.5.7. LIGATION DES ADAPTATEURS AUX FRAGMENTS D'ADNC TESTER DIGÉRÉS

Le protocole suivant décrit la synthèse de la population d'ADNc *tester*. La ligation des adaptateurs sur les ADNc provenant de la variété Atlas-66 a été réalisée pour des quantités doublées afin de disposer d'une quantité suffisante d'ADNc *tester* pour la réalisation de deux séries d'hybridations : une pour la banque 3, l'autre pour les banques 4 et 5. Ainsi les trois banques obtenues (3, 4 et 5) pourront être comparées puisque les ADNc seront issus de la même réaction de synthèse. Pour ne pas alourdir le texte, les données techniques suivantes ne décrivent les conditions que pour des quantités simples (banque 1 et 2) et non doubles (banque 3, 4 et 5).

Un microlitre d'ADNc double-brin *tester* digérés par *Rsa* I est dilué avec 5 μl d'eau stérile. De cette dilution, 4 μl vont être prélevés pour effectuer la ligation selon les conditions suivantes : deux microlitres d'ADNc double-brins *tester* digérés *Rsa* I dilués vont être ligués avec l' Adaptateur 1 ou l'Adaptateur 2R à 2 μM (**Tableau 2.3**), du Tris-HCl pH7,8 50 mM, MgCl_2 10 mM, DTT 2 mM, BSA 0,05 mg/ml, de la *T4 DNA Ligase* (CLONTECH) 400 U, de l'ATP 0,3 mM. Les réactions de ligation sont incubées à 16°C toute la nuit. Elles sont arrêtées en ajoutant 1 μl de 20X

EDTA/Glycogen Mix et en chauffant 5 minutes à 72°C. Les tubes sont conservés à –20°C.

2.5.8. PREMIÈRE HYBRIDATION TESTER/DRIVER POUR CHAQUE SÉRIE D'ADAPTATEUR

Pour limiter au maximum les variations des conditions expérimentales, une même réaction d'hybridation *tester/driver* a été utilisée pour la réalisation des banques 1 et 2 (notée 1+2). De la même façon, une autre réaction a été utilisée pour la réalisation des banques 4 et 5 (notée 4+5).

Les conditions expérimentales utilisées pour les premières hybridations ont été les suivantes : 1,5 µl d'ADNc double-brins *driver* digérés (banque 1+2 et 3) ou non-digéré (banque 4+5) par *Rsa I* ont été incubés avec 1,5 µl de *tester* ligué avec adaptateur 1 ou de *tester* ligué avec adaptateur 2R en présence du *Hybridization Buffer* (CLONTECH) 1X. Une goutte d'huile minérale est déposée au sommet des réactions d'hybridation pour limiter l'évaporation. Les échantillons sont chauffés à 98°C pendant 1,5 minutes pour dénaturer les structures double-brin et sont ensuite incubés dans un thermocycleur à 68°C pendant 8 heures pour permettre l'hybridation. La deuxième hybridation est alors aussitôt effectuée.

2.5.9. MÉLANGE DES TESTERS ET DEUXIÈME HYBRIDATION CONTRE LE DRIVER

A 1 µl ADNc double-brin *driver* digéré ou non par l'enzyme *Rsa I* (selon les banques), 1 µl de 4X *Hybridization Buffer* et 2 µl d'eau sont ajoutés. Les ADNc du *driver* sont dénaturés par une incubation de 1,5 minutes à 98°C. Les tubes de *tester* précédents et ces nouveaux ADNc *driver* fraîchement dénaturés sont alors réunis et mis à incuber à 68°C toute la nuit. Cent microlitres de *Dilution Buffer* (HEPES-HCl pH8,3 20 mM, NaCl 50 mM, EDTA pH8 200 µM) à température ambiante sont

ensuite ajoutés (au lieu des 200 µl préconisés par CLONTECH). Les tubes sont incubés 7 minutes à 68°C puis conservés à -20°C.

2.5.10. REMPLISSAGE DES EXTREMITÉS 3' ET AMPLIFICATION PCR

Un microlitre des produits dilués dans le *Dilution Buffer* de la deuxième hybridation est utilisé pour effectuer les étapes de remplissage des extrémités et de PCR. Le protocole standard utilisé pour le remplissage des extrémités 3' de la banque 1 fût le suivant : un microlitre de produit de deuxième hybridation est incubé avec *PCR Reaction Buffer* (CLONTECH) 1X, *PCR Primer 1* 2µM, dNTP 0,2 mM, *Advantage cDNA Polymerase mix* (CLONTECH) 1X. Le remplissage des extrémités 3' s'effectue par une incubation à 75°C durant 5 minutes. Les ADN sont ensuite dénaturés 25 secondes à 94°C et 27 cycles d'amplifications sont effectués (30 sec 94°C, 30 sec 66°C, 90 sec 72°C). Le remplissage des extrémités 3' de la banque 2 diffère de celui de la banque 1 par l'ajout de 500 ng d'ARN poly A⁺ du *driver* et 10 µg d'ARN totaux du *driver* au produits de deuxième hybridation. Le tout est dénaturé 5 minutes à 95°C avant de procéder à l'ajout des autres réactifs. Le remplissage des extrémités 3' de la banque 3 diffère de celui de la banque 1 par la diminution de la température d'hybridation des amorces à 60°C et une augmentation du nombre de cycle PCR à 28. Enfin le remplissage des extrémités 3' des banques 4 et 5 diffère de celui de la banque 3 par le remplacement de la polymérase de CLONTECH par la *Native Taq DNA polymerase* d'INVITROGEN.

L'*Advantage cDNA Polymerase Mix* de CLONTECH est un mélange enzymatique de l'ADN polymérase Klen Taq-1, d'une ADN polymérase ayant une activité correctrice 3'→ 5' et d'un anticorps antiTaq pour garantir le départ de la PCR en haute température (*hot start*). L'ADN polymérase Klen Taq-1 résulte d'une délétion N-terminale de l'ADN polymérase de *Thermus aquaticus* conduisant à une

faible activité 5' exonucléase. L'ADN polymérase *Native Taq DNA polymerase* d'INVITROGEN ne possède pas d'activité 5' et 3' exonucléase mono-brin ou double-brin. Elle ne possède qu'une activité 5'→3' exonucléase synthèse-dépendante : c'est-à-dire qu'elle ne peut dégrader que le brin situé devant elle lors d'une synthèse.

Trois microlitres des produits de PCR sont dilués dans 27 µl d'eau stérile. Les tubes PCR et de dilution sont conservés à -20°C.

Tableau 2.3 : Séquences des différents adaptateurs et amorces de SSH.

Molécules	Séquences
Adaptateur 1 (double brin)	$5' \xrightarrow{\text{PCR primer 1}} \xrightarrow{\text{Nested PCR primer 1}} 3'$ $5' \text{CTAATACGACTCACTATAGGGCTCGAGCGGCCCGCCGGGCAGGT} 3'$ $3' \text{GGCCCGTCCA} 5'$ $\frac{1}{2} \text{Rsa I}$
Adaptateur 2R (double brin)	$5' \xrightarrow{\text{PCR primer 1}} \xrightarrow{\text{Nested PCR primer 2R}} 3'$ $5' \text{CTAATACGACTCACTATAGGGCAGCGTGGTCGCGGCCGAGGT} 3'$ $3' \text{GCCGGCTCCA} 5'$ $\frac{1}{2} \text{Rsa I}$
PCR primer 1	$5' \text{CTAATACGACTCACTATAGGGC} 3'$
Nested PCR Primer 1	$5' \text{TCGAGCGGCCCGCCGGGCAGGT} 3'$
Nested PCR Primer 2R	$5' \text{AGCGTGGTCGCGGCCGAGGT} 3'$

2.5.11. AMPLIFICATION PCR NICHÉE

Un microlitre des produits dilués issus de la première PCR est utilisé pour l'étape de PCR nichée (*nested-PCR*). Les conditions utilisées pour réaliser les réactions de PCR nichée pour les différentes banques sont décrites dans les paragraphes suivants. Après amplification, les réactions de PCR nichée sont conservées à -20°C. Les conditions de PCR nichée pour la banque 1 furent les suivantes : produits première PCR dilués au 1/250, *PCR Reaction Buffer* (CLONTECH) 1X, *Nested-PCR Primer 1* 0,4 µM, *Nested-PCR Primer 2R* 0,4 µM,

dNTP 0,2 mM, *Advantage cDNA Polymerase Mix* (CLONTECH) 1X, dénaturation à 94°C durant 30 secondes et 20 cycles d'amplification (30 sec 94°C, 30 sec 68°C, 90 sec 72°C). Les conditions de PCR nichée pour la banque 2 furent les suivantes : produits première PCR dilués au 1/250, ajout de 500 ng d'ARN poly A⁺ du *driver*, ajout de 10 µg d'ARN totaux du *driver*, première étape de dénaturation à 95°C durant 5 minutes, *PCR Reaction Buffer* (CLONTECH) 1X, *Nested-PCR Primer 1* 0,4 µM, *Nested-PCR Primer 2R* 0,4 µM, dNTP 0,2 mM, *Advantage cDNA Polymerase Mix* (CLONTECH) 1X, dénaturation à 94°C durant 30 secondes et 41 cycles d'amplification (30 sec 94°C, 30 sec 68°C, 90 sec 72°C). Les conditions de PCR nichée pour la banque 3 furent les suivantes : produits première PCR dilués au 1/250, *PCR Reaction Buffer* (CLONTECH) 1X, *Nested-PCR Primer 1* 0,4 µM, *Nested-PCR Primer 2R* 0,4 µM, dNTP 0,2 mM, *Advantage cDNA Polymerase Mix* (CLONTECH) 1X, dénaturation à 95°C durant 30 secondes et 30 cycles d'amplification (30 sec 95°C, 30 sec 68°C, 90 sec 72°C). Les conditions de PCR nichée pour la banque 4 furent les suivantes : produits première PCR dilués au 1/250, *PCR Reaction Buffer* (INVITROGEN) 1X, *Nested-PCR Primer 1* 0,4 µM, *Nested-PCR Primer 2R* 0,4 µM, dNTP 0,2 mM, MgCl₂ 1,5 mM, *Native Taq DNA polymerase* (INVITROGEN) 2,5 U, dénaturation à 95°C durant 30 secondes et 30 cycles d'amplification (30 sec 95°C, 30 sec 68°C, 90 sec 72°C). Les conditions de PCR nichée pour la banque 5 furent les suivantes : produits première PCR dilués au 1/250, *PCR Reaction Buffer* (INVITROGEN) 1X, *Nested-PCR Primer 1* 0,4 µM, *Nested-PCR Primer 2R* 0,4 µM, dNTP 0,2 mM, MgCl₂ 1,5 mM, *Native Taq DNA polymerase* (INVITROGEN) 2,5 U, 10 µg d'ARN de *driver*, dénaturation à 95°C durant 30 secondes et 30 cycles d'amplification (30 sec 95°C, 30 sec 68°C, 90 sec 72°C).

Les différences majeures de protocoles sont : (i) le nombre de cycles de PCR nichée qui a été augmenté de 20 à 30 pour les banques 3, 4 et 5 afin de pousser les performances des SSH modifiées à leur maximum et bien observer au mieux les

différences entre les divers protocoles (ii) l'ajout ou non d'ARN et enfin (iii) l'utilisation d'ADN polymérase sans activité exonucléase.

2.5.12. CRIBLAGE DES BANQUES SSH

Les fragments de gènes ainsi amplifiés par l'étape de PCR nichée lors des diverses banques SSH ont été clonés dans le vecteur pGEM[®]-T ou pGEM[®]-T_{easy} de PROMEGA selon les conditions décrites par le fournisseur. Les clones blancs et bleus clairs obtenus (après sélection par IPTG/X-Gal) ont été repiqués un à un dans 200 µl de milieu de culture LB contenant de l'ampicilline (150 µg/ml) sur des plaques en polypropylène de 96 puits. Les bactéries ont été incubées toute la nuit à 37°C, laissées sédimenter au moins 2 heures à 4°C ou centrifugées 5 min à 2000 g. Cinq microlitres de chacun des culots bactériens ont été déposés sur un filtre de nylon. Les bactéries ont été lysées et l'ADN a été fixé sur la membrane selon les conditions standard d'hybridation sur colonies (**Sambrook *et al.*, 1989**).

Le criblage des banques SSH a été effectué par hybridation sur colonie selon un protocole dérivé de celui utilisé par **Grunstein et Hogness (1975)**. Pour cela, deux sources d'ADNc ont été utilisées. La première est issue de la transcription inverse d'ARN totaux de *driver* et de *tester* traités à la RQ1 à l'aide du Kit Reverse Transcription System de PROMEGA. Il est rappelé ici que le *driver* est représenté par le matériel génétique de la variété sensible Fundy exposée à 5 µM d'aluminium et que le *tester* est représenté par le matériel génétique de la variété tolérante Atlas-66 exposée à 50 µM d'aluminium. Cette première source d'ADNc représentait en majorité les gènes très ou moyennement abondants car fortement représentés dans les populations d'ARNm mais aussi des ARNr pouvant être rétrotranscrits et donc très facilement marqués à la radioactivité. Une autre source d'ADNc a donc été utilisée pour représenter les gènes moyennement et peu abondants. Ces ADNc sont issus des

produits PCR générés par le Kit GeneRacer d'INVITROGEN à partir d'ARN poly A⁺ d'Atlas-66 et Fundy (**Chapitre 2: 2.8.1**). Ils ont été rétro-transcrits de la même façon que précédemment. Ces nouveaux ADNc correspondent essentiellement à des ARNm et non plus à des ARNr ou ARNt contaminants. Le criblage à la radioactivité se retrouve plus efficace et plus spécifique des gènes transcrit en ARNm. Le marquage au ³²P des ADNc et les tests de *northern blot* réalisés sur les clones retenus ont été réalisés selon le protocole décrit par Houde *et al.*, 1992 .

2.5.13. COMPARAISONS DES BANQUES SSH

Les profils des différents amplifiats de PCR nichée des banques SSH ont été analysés par migration électrophorétique sur gel d'agarose. Cependant, pour les banques 3, 4 et 5 des analyses PCR ont été effectuées pour évaluer l'abondance dans ces banques de gènes connus. Les conditions PCR furent les suivantes : produits PCR SSH dilués au 1/10, *PCR Reaction Buffer* (AMERSHAM) 1X, Amorce UNI (**Tableau 2.4**) 0,4 μM, Amorce REV (**Tableau 2.4**) 0,4 μM, dNTP 0,2 mM, *Recombinant Taq DNA polymerase* (AMERSHAM) 2,5 U, dénaturation à 95°C durant 5 min, 5 premiers cycles d'amplification (30 sec 95°C, 30 sec 60°C, 90 sec 72°C) et 35 autres cycles (30 sec 95°C, 120 sec 72°C) et enfin 5 minutes d'élongation à 72°C.

Trois gènes connus ont été utilisés pour évaluer la qualité des banques SSH ont été : le gène OXO codant pour une oxalate oxydase, le gène 48E8 codant pour une protéine d'hypersensibilité (réaction de défense des plantes contre les pathogènes et maladie) et le gène 49A1 codant probablement pour un transporteur d'oligo-peptide proton dépendant. Les séquences d'amorces utilisées ainsi que les tailles théoriques des amplifiats sont mentionnées dans le **Tableau 2.4** suivant.

Tableau 2.4 : Séquences des amorces utilisées pour amplifier les gènes contrôles.

Amorce	Séquence	Taille attendue
OXO UNI OXO REV	^{5'} CCTCCTTGTTTCTCCTCGCCGTGCTTCT ^{3'} ^{5'} CAGCTGCTGGCTTGTCATGCGCTAGATTC ^{3'}	501 pb
48E8 LONG UNI 48E8 LONG REV	^{5'} ATGAACATGTGAAGAGAGCCATGAATGAGATCAATG ^{3'} ^{5'} ATATCCATGACATCCTTCGAAGAGGTCCCAGG ^{3'}	247 pb
49A1 LONG UNI 49A1 LONG REV	^{5'} GAGTTCTTCTACGACCAGCCCCGGAGTC ^{3'} ^{5'} CATTATCTTTTGTATCTGGACGAGCAGTAGACGAACTG C ^{3'}	245 pb

2.6. RT-PCR DES GÈNES 49E8 ET 49A1

L'analyse par *RT-PCR* des gènes 48E8 et 49A1 a été effectuée à partir des ARN de 4 variétés de blé : Atlas-66, OK91G106, Fundy et OK91G108 exposées à 0 μM , 5 μM et 50 μM d'Al. Les ARN ont été dosés par densité optique et leur quantité a été réévaluée à l'aide du programme QuantityOne de BIORAD comme décrit dans la section **Chapitre 2: 2.4**. La transcription inverse a été réalisée à partir d'un microgramme d'ARN totaux pour chaque condition expérimentale à l'aide du kit Reverse Transcription System de PROMEGA. Environ 50 ng d'ADNc ont été utilisés pour effectuer les PCR selon les conditions suivantes : *PCR Reaction Buffer* (AMERSHAM) 1X, Amorce UNI (**Tableau 2.5**) 0,2 μM , Amorce REV (**Tableau 2.5**) 0,2 μM , dNTP 0,2 mM, *Recombinant Taq DNA polymerase* (AMERSHAM) 2,5 u, dénaturation à 95°C durant 2 min, 40 cycles d'amplification (30 sec 95°C, 30 sec 56°C, 30 sec 72°C) et enfin 5 minutes d'élongation à 72°C.

Tableau 2.5 : Amorces utilisées pour les tests de RT-PCR spécifiques des gènes 48E8 et 49A1.

Amorce	Séquence	Taille attendue
48E8 UNI	5'ATGAACATGTGAAGAGAGCC ^{3'}	247 pb
48E8 REV	5'ATATCCATGACATCCTTCGA ^{3'}	
49A1 UNI	5'GAGTTCTTCTACGACCAGCC ^{3'}	245 pb
49A1 REV	5'CATTATCTTTTGTATCTGGACGA ^{3'}	

2.7. PCR EN TEMPS RÉEL DU GÈNE 49A1

La PCR en temps réel permet d'estimer plus finement que les analyses classiques de *northern blot* la dérégulation d'un gène entre diverses populations d'ARNm. En fait, elle quantifie par des procédés d'amplification PCR le nombre de molécule d'ADNc réciproque des ARNm messagers d'intérêt entre les diverses populations d'ARNm étudiées. Elle est basée sur l'utilisation d'un thermocycleur spécial où sont disposés des capteurs de fluorescence pour chaque tube réactionnel. Ces capteurs sont capables pour chaque cycle PCR de quantifier le nombres de brins d'ADN nouvellement synthétisés par l'utilisation de molécules fluorescentes. En effet, à chaque cycle de PCR, le nombre de molécules d'ADN est théoriquement doublé. Il en résulte que le nombre de molécules fluorescentes fixées sur les ADN double brins est lui aussi doublé. Une fois fixées sur les brins d'ADN, ces molécules sont capables d'émettre un signal de fluorescence à une certaine longueur d'onde. C'est cette fluorescence qui est détectée par les capteurs du thermocycleur. Ainsi, à chaque signal de fluorescence correspond la synthèse d'un nouveau brin d'ADN.

Pour réaliser les études PCR en temps réel, la quantité des ARN a été réestimée à l'aide du RiboGreen Kit (MOLECULAR PROBE) selon les conditions décrites par le fournisseur. La quantification des ARN par RiboGreen est garantie plus sensible qu'une lecture la densité optique à 260 nm. Les transcriptions inverses ont été effectuées de la même façon que précédemment.

L'analyse de l'expression du gène 49A1 par PCR en temps réel s'est faite à l'aide du kit Sybr Green PCR Master Mix (APPLIED BIOSYSTEMS) et du thermocycleur 7000 Sequence Detection System d'ABI prism. L'expression du gène codant pour l'enzyme GA₃PDH cytosolique a servi de référence interne. Cette enzyme appartient au métabolisme de base cellulaire (*house keeping gene*) et la quantité de ses ARNm transcrits est considérée comme constante au cours du temps. Pour chaque condition physiologique testée, cinquante nanogrammes d'ADNc ont été utilisés afin de réaliser les cycles de PCR suivants : 2 min 50°C, 10 min 95°C (20sec 95°C, 60 sec 60°C)₄₅. Les amorces de PCR en temps réel ont été déterminées à l'aide du logiciel Primer Express® v2.0 (APPLIED BIOSYSTEMS). Leurs séquences et la taille des amplifiats attendus sont décrites dans le **Tableau 2.6** suivant.

Tableau 2.6 : Séquences des amorces utilisées dans les réactions de PCR en temps réel.

Amorce	Séquence	Taille attendue
49A1 12F 49A1 73R	5'TCGGCATGCTCGAGTTCTT ^{3'} 5'TGCCACACCCAGGCTCTT ^{3'}	61 pb
GA3PDH F3 GA3PDH R3	5'TTGAGGGTTTGATGACCACAGTT ^{3'} 5'TCCACCTCTCCAGTCCTTGCT ^{3'}	86 pb

2.8. BANQUES D'EXPRESSION DE PROTÉINES GATEWAY

Afin de tester l'hypothèse de travail selon laquelle la tolérance à l'aluminium pourrait être due à l'existence d'isoformes de protéines, une autre stratégie a été élaborée. Cette stratégie est basée sur l'expression de banques de protéines chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Ces banques devaient être construites dans des systèmes permettant facilement leur transfert vers d'autre vecteur afin de réaliser dans les années à venir des tests d'expression chez la plante *Arabidopsis thaliana*. La construction des banques a été réalisée à partir de deux technologies de la compagnie INVITROGEN : le système GeneRacer qui permet l'amplification spécifique d'ADNc

de pleine longueur évitant ainsi la contamination des banques par les gènes ribosomiques et le système de recombinaisons Gateway qui permettent le basculement d'un vecteur à un autre des séquences d'ADNc avec une haute efficacité. Ces deux systèmes ont été modifiés pour être compatibles entre eux. Toute cette partie des travaux résulte d'une collaboration étroite avec Josée Demers, étudiante à la Maîtrise de Biologie de l'Université du Québec à Montréal et Jeffrey P. Jonston (Ph. D) des services du support technique d'INVITROGEN Canada.

2.8.1. MODULATION DU SYSTÈME GENE RACER D'INVITROGEN

Le principe du système GeneRacer ainsi que les modifications qui y ont été apportées sont représentés dans la **Figure 2.4**. Lors d'une extraction d'ARN, la population d'ARN obtenue est un mélange d'ARN non-messagers (ARNr, ARNt) avec des ARNm messagers intacts (coiffe guanidine méthylée présente) ou abîmés (tronqués, coiffe absente). Le procédé GeneRacer débute par un premier traitement par une phosphatase qui supprime les groupements phosphate en 5' des ARN non-messagers et des ARN messagers abîmés. Un deuxième traitement enzymatique par une pyrophosphatase de Tabac permet de générer un groupement phosphate en 5' des ARN messagers intacts à partir de leur coiffe de guanidine méthylée. Par la suite, un oligo d'ARN est alors ligué sur ces nouveaux groupements phosphate obtenus. Les ARN messagers intacts sont par la suite rétrotranscrits grâce à un oligo poly(dT) se fixant sur leur queue 3' poly(dA). Cette rétrotranscription comprend aussi la séquence de l'oligo ARN nouvellement fixé sur les molécules d'ARNm. Il est donc possible à cette étape d'amplifier par PCR les molécules d'ADNc simple brin par l'utilisation d'amorces spécifiques des séquences de l'oligo d'ARN ajouté en 5' et de l'oligo poly(dT) utilisé pour la rétrotranscription.

La première modification apportée au procédé GeneRacer pour le rendre compatible avec la technologie Gateway concerne l'*oligo dT Primer* sur lequel a été

ajouté la séquence AttB2 nécessaire à la réaction BP clonase du système Gateway (Tableau 2.7). La deuxième modification concerne l'étape de PCR où l'amorce 3' est une amorce AttB2 Biotinylée dont une partie de la séquence est similaire à celle de l'*oligo dT Primer* (Tableau 2.7).

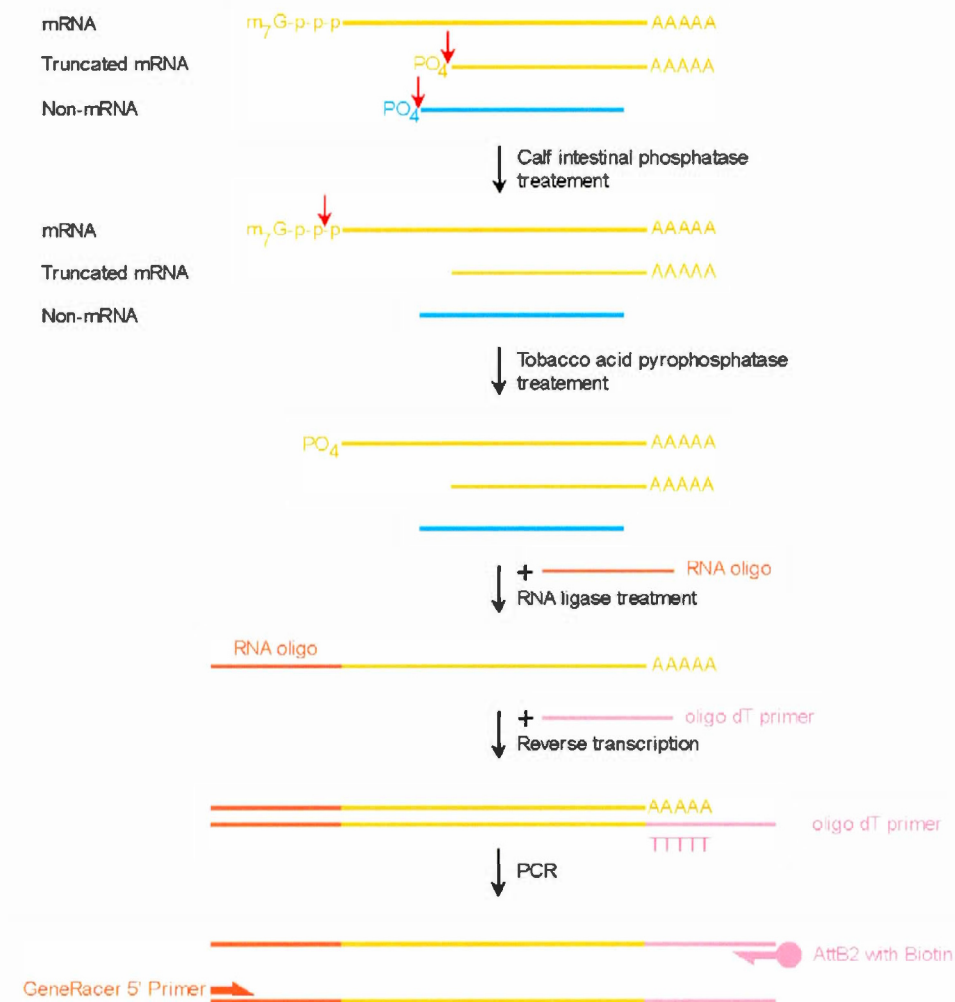


Figure 2.4 : Principe du système GeneRacer modifié.

Les banques d'expression ont été effectuées à partir d'ARNm du blé tolérant Atlas-66 mais aussi du riz, une plante naturellement très résistante à l'aluminium.

Le procédé GeneRacer a été effectué à partir d'ARN poly A⁺ du blé tolérant Atlas-66 exposé à 50 µM d'Al, du blé sensible Fundy exposé à 5 µM d'Al et de riz exposé à 200 µM d'Al. Les ARN ont été purifiés à l'aide du kit Dynabeads® mRNA purification kit de DYNAL BIOTECH.

Tableau 2.7 : Séquences nucléotidiques des amorces utilisées dans le système GeneRacer.

Amorce	Séquence
GeneRacer RNA oligo	GeneRacer 5'Primer 5'CGACUGGAGCACGAGGACACUGACAUGGACUGAAGGAGUAGAAA ^{3'}
GeneRacer Oligo dT Primer	5'GCTGTCAACGATACGCTACGAAACGGCATGACAGTG(T) ₁₈ ^{3'}
GeneRacer 5' Primer	5'CGACTGGAGCACGAGGACACTGA ^{3'}
3' Primer Biotin (AttB2-Biotine)	5' <i>Biotine</i> GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGCTGTCAACGAT GeneRacer OligodT Primer ACGCTACGTAACGGCATGACAGTG ^{3'}

Toutes les différentes étapes expérimentales ont été effectuées selon le protocole décrit par INVITROGEN dans leur kit GeneRacer. La PCR finale GeneRacer a été réalisée selon les conditions suivantes : Produit GeneRacer (RT) dilué 1/50, *PCR Reaction Buffer* (CLONTECH) 1X, *GeneRacer 5' Primer* 0,2 µM, AttB2-Biotine 0,2 µM, dNTP 0,2 mM, *Advantage cDNA Polymerase mix* (CLONTECH) 1X, dénaturation à 94°C durant 30 sec, 40 cycles d'amplification (30 sec 94°C, 2 min 64°C, 6 min 68°C) et enfin 5 minutes d'élongation à 68°C.

Vingt microlitres de produits PCR ont ensuite été purifiés sur une colonne Microcon (MILLIPORE) selon les conditions du fournisseur.

2.8.2. LE SYSTÈME GATEWAY D'INVITROGEN

Le système Gateway repose sur deux réactions enzymatiques de clonase. Ces réactions constituent des réactions similaires à des événements de recombinaisons homologues. Par l'utilisation simultanée de ces deux types de réactions enzymatiques, il est possible de transférer rapidement des séquences d'ADN d'un vecteur à un autre. Le système Gateway a été sélectionné pour pouvoir transférer les banques d'expression de protéine construites dans différents organismes notamment la levure *Saccharomyces cerevisiae*, ce qui a été réalisé durant cette thèse mais aussi d'autre organisme comme la plante *Arabidopsis thaliana*, ce qui constitue une perspective de travail.

Les produits PCR du procédé GeneRacer modifié sont liés en 5' à un adaptateur possédant la séquence AttB1 (**Figure 2.5**). Des molécules d'ADN ayant une séquence AttB1 en 5' et une séquence AttB2 en 3' sont ainsi obtenues (**Figure 2.5**). Ces molécules se retrouvent donc orientées par ces deux séquences AttB, le codon Start ATG des ADNc se trouvant du côté AttB1. Ces molécules AttB1-Gene-AttB2 sont mises en présence d'un vecteur appelé "donneur" comprenant de façon orientée les séquences AttP1 et AttP2 autour du gène suicide *ccdB*. Ce gène *ccdB* est létal pour la plupart des variétés commerciales d'*E. coli*. Par l'utilisation du mélange enzymatique BP, les séquences d'ADNc se retrouvent transférées dans le plasmide alors que le gène *ccdB* se retrouve sous forme d'une molécule linéaire libre. Les produits de la réaction enzymatique BP servent alors à transformer des bactéries *E. coli*. Les bactéries sont mises en suite en présence de l'antibiotique de sélection correspondant au gène de résistance R1 présent sur le vecteur "donneur". Les bactéries transformées avec les fragments d'ADN linéaire d'ADNc ou du gène *ccdB* périront. Les bactéries transformées avec le vecteur "donneur" n'ayant pas recombiné périront aussi puisqu'elles exprimeront le gène létal *ccdB*. Seules survivront les bactéries ayant un plasmide recombiné où le gène *ccdB* a été remplacé par une séquence d'ADNc. Ces nouveaux vecteurs obtenus sont appelés vecteurs "entrée".

Dans ces nouveaux vecteurs, les séquences AttP1 et AttP2 ont été remplacées respectivement par les séquences nucléotidiques AttL1 et AttL2 par le mélange enzymatique BP. Une banque plasmidique d'ADNc appelée "entrée" est ainsi disponible dans *E. coli*. Par un nouveau jeu enzymatique dit LR, il est possible de transférer tous ces ADNc dans un autre vecteur, un vecteur appelé "destination" car il possède tous les éléments nécessaires pour l'expression protéique dans un autre organisme, par exemple la levure. La réaction LR est donc effectuée, et ainsi les ADNc sont transférés de la même façon sur le nouveau vecteur. Les plasmides obtenus servent à transformer dans un premier temps les bactéries *E. coli* pour avoir une haute efficacité de transformation. Les transformants sont sélectionnés grâce à l'antibiotique correspondant au gène de résistance R2 du vecteur de destination. Une nouvelle collection de vecteurs appelés d'"expression" est ainsi obtenue. Elle servira à transformer l'organisme visé pour l'expression protéique, par exemple la levure, en utilisant le gène de résistance R3. A la fin de la réaction LR, les nouveaux plasmides d'"expression" générés possèdent des séquences AttB1 et AttB2 à la place des séquences AttR1 et AttR2. De nouvelles réactions BP sont donc de nouveau possible à ce stade rendant les possibilités de transfert Gateway infini.

Les produits PCR purifiés sont ligués à l'adaptateur AttB1 (**Tableau 2.8**) selon le protocole suivant : dix microlitres de produits PCR sont ligués avec du *Ligation Buffer* (INVITROGEN), de l'Adaptateur AttB1 à 1 μ M, et de la T4 DNA Ligase (INVITROGEN) 1 U à 40°C durant 16 heures. Les produits de ligation sont purifiés de la même façon que précédemment sur une colonne Microcon (MILLIPORE) selon les conditions du fournisseur.

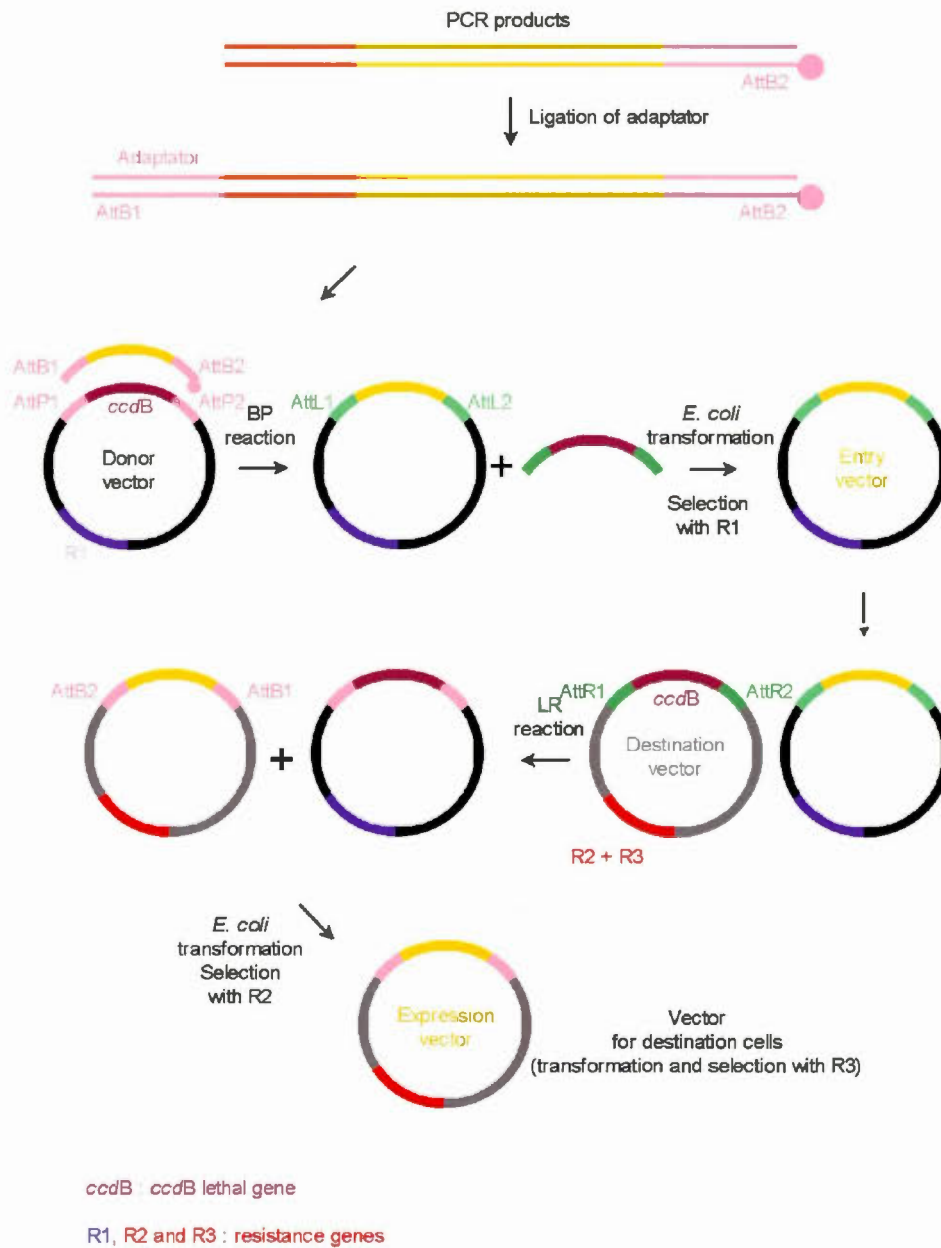


Figure 2.5 : Construction d'une banque d'expression Gateway à partir des produits PCR GeneRacer.
Schéma de la combinaison des kits GeneRacer et Gateway d'INVITROGEN.

Tableau 2.8 : Séquence de l'adaptateur AttB1.

Adaptateur AttB1 (double brin)	$5'$ TCGTCGGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTT $3'$ $3'$ CCCCTGTTCAAACATGTTTTTTCGTGCGA $5'$
-----------------------------------	--

Les protocoles utilisés pour les réactions de clonase BP et LR ont été modifiés par rapport à ceux décrits par INVITROGEN afin d'augmenter l'efficacité des réactions. Le protocole de la réaction BP fût le suivant : 41,25 ng de produits de ligation purifiés sont incubés dans du Tris HCl pH8 4 mM, *BP Buffer* (INVITROGEN) 1X avec 75 ng de vecteur pDON201 (**Figure 2.6**) et un microlitre de *BP clonase mix* (INVITROGEN) durant 16 heures à 25°C. Le protocole de la réaction LR fût le suivant : 150 ng d'ADN de la banque "Entrée" sont incubés dans du Tris HCl pH8 4 mM, *LR Buffer* (INVITROGEN) 1X avec 150 ng de vecteur pYES-DEST52 (**Figure 2.7**) et un microlitre de *LR clonase mix* (INVITROGEN) durant 16 heures à 25°C.

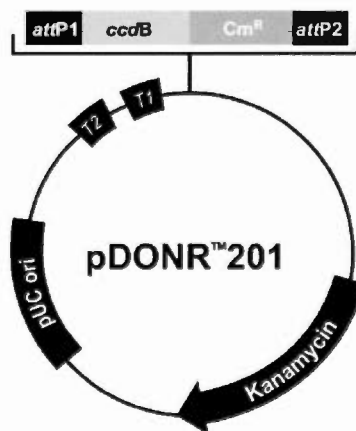


Figure 2.6 : Carte du plasmide pDONR201.
 Carte obtenue auprès de la compagnie INVITROGEN.

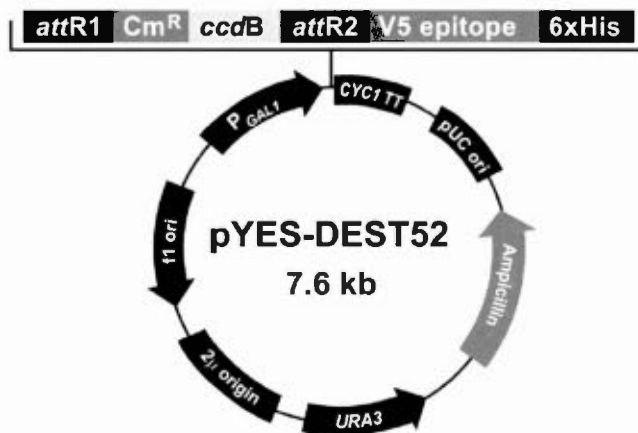


Figure 2.7 : Carte du plasmide pYES-DEST52.
Carte obtenue auprès de la compagnie INVITROGEN.

Les produits issus de la réaction BP sont traités à la protéinase K pendant 10 minutes à 37°C. Le volume est ensuite ramené à 10 µl par ajout de 4,5 µl d'eau. Un microlitre de cette dilution est utilisé pour transformer par électroporation la souche *E. coli* ElectroMAX DH10B (INVITROGEN). Après une nuit de croissance en présence de l'antibiotique de sélection (Kanamycine), les plasmides sont extraits, purifiés et dosés par densité optique. L'ensemble de ces plasmides constitue la banque "entrée". Cette banque est ensuite utilisée pour effectuer la réaction LR. L'utilisation du plasmide pYES-DEST52 (**Figure 2.7**) permet de construire une banque d'expression des gènes dans la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Les produits de la réaction LR sont traités de la même façon à la protéinase K et ils sont utilisés pour transformer la même souche de bactéries. La banque "expression" est ainsi obtenue. La qualité des différentes banques a été déterminée par la présence de gène connus comme il l'a été expliqué à la section **Chapitre 2: 2.5.13 (Tableau 2.4)**.

2.8.3. TRANSFORMATION ET EXPRESSION DANS LA LEVURE

Les banques d'expression ont été introduites dans la levure à l'aide du système *S.c.* EasyComp Transformation kit (K5050-01) d'INVITROGEN. Des modifications ont été apportées au protocole suggéré par la fabricant. Dix millilitres de milieu YPD ont été inoculés avec une colonie de la souche de levure INVSc-1 et ont été incubés une nuit à 30 °C avec agitation (250 rpm). Le lendemain, les cellules ont été diluées jusqu'à l'obtention d'une DO à 600nm de 0.2 dans un volume total de 10 ml (milieu YPD). Les levures ont été mises à pousser à 30 °C (250 rpm) jusqu'à l'obtention d'une DO à 600nm de 0.6. Les cellules ont été centrifugées 5 minutes à 500 x g à la température de la pièce, le surnageant enlevé et les levures resuspendues dans 10 ml de solution I. Une seconde centrifugation a été effectuée dans les mêmes conditions et les levures resuspendues dans 500 µl de solution II. À ces 500 µl de levures, 50 µg d'ADN de la banque d'expression (issus d'*E. coli*) ont été ajoutés ainsi que 5 ml de solution III (INVITROGEN). Le mélange est ensuite agité vigoureusement et incubé pour 1 heure 30 minutes à 30 °C et homogénéisé toutes les 10 minutes pendant l'incubation.

Les analyses des banques d'expression de levures ont été réalisées en présence d'aluminium dans un milieu SC modifié. Ce milieu nommé LPM est caractérisé par un faible pH de 3.5 et par une faible concentration de phosphate, soit 25 µM K₂HPO₄, ce dernier ayant tendance à former des précipités en présence d'aluminium. De plus, la concentration de potassium a été élevée à 5 mM par l'ajout de KCl et la concentration de magnésium (MgCl₂) a été diminuée à 200 µM.

Une première solution (Yeast nitrogen base without amino acids 6.7 g·l⁻¹ ; (NH₄)₂SO₄ 5 g·l⁻¹ ; NaCl 0.1 g·l⁻¹ ; CaCl₂ 0.1 g·l⁻¹ ; KCl : 5 mM ; MgCl₂ 200 µM ; KH₂PO₄ 25 µM ; Acide borique 500 m g·l⁻¹ ; Copper sulfate 40 mg·l⁻¹ ; Potassium iodine 100 mg·l⁻¹ ; Ferric chloride 200 mg·l⁻¹ ; Sulfate de manganèse 400 mg·l⁻¹ ; Molybdate de sodium 200 mg·l⁻¹ ; Sulfate de zinc 400 mg·l⁻¹ ; Gel-Gro 0.5% pour les milieux solides) a été réalisée à partir d'eau milli-Q puis a été autoclavée. Le pH a été

ajusté à 3.5. Une fois le milieu tiède, des vitamines (Biotine 2 mg·l⁻¹ ; Calcium pantothénate 400 mg·l⁻¹ ; Acide folique 2 mg·l⁻¹ ; Inositol 2000 mg·l⁻¹ ; Niacine 400 mg·l⁻¹ ; Acide p-aminobenzoïque 200 mg·l⁻¹ ; Pyrodoxine hydrochloride : 400 mg·l⁻¹ ; Riboflavine 200 mg·l⁻¹ ; Thiamine hydrochloride 400 mg·l⁻¹), des acides aminés (Yeast synthetic Drop-out medium supplement (0.2%) (SIGMA) avec ou sans Uracile selon les conditions expérimentales) et une source de carbone (2% D-(+)-glucose, 2% D-(+)-raffinose et 2% sucrose) ont été ajoutés. Le milieu ainsi obtenu est appelé LPM.

Lors de ces tests de résistance, le glucose est remplacé par 2% D-(+)-galactose pour induire l'expression des protéines. De l'aluminium préalablement filtré est ajouté au milieu sous forme de chlorure d'aluminium. Pour les milieux solides, l'aluminium a été ajouté par imbibition grâce à une solution de pH 3,5 en concentration 2X (par rapport au volume du milieu solide). La diffusion a été réalisée durant 48 heures puis les solutions d'aluminium sont jetées et les pétris séchés avant étalement.

Les levures transformées ont été mises en milieu LPM à 30 °C sous agitation à 250 rpm pour une nuit. Le lendemain, les levures ont été centrifugées 5 min à 1000 g et lavées deux fois avec de l'eau milli-Q autoclavée. Puis les cellules ont été resuspendues dans le même volume de milieu LPM avec 75 µM d'aluminium et remises à 30 °C avec agitation (250 rpm). La densité optique a été prise de façon régulière à 600nm durant plusieurs jours. Après plusieurs repiquages au 1/10, les clones représentant des clones tolérants l'aluminium ont été étalés sur milieu solide et isolés. Ils ont été remis en culture afin d'extraire leur ADN plasmidique et déterminer la séquence d'ADN porté par le vecteur d'expression.

Les levures mises en milieu liquide ont poussé à 30 °C pour une période allant de 18 à 24 heures avec agitation constante à 250 rpm. Celles mises sur milieu solide ont poussé à 30°C pour un minimum de 3 jours.

2.8.4. EXTRACTIONS D'ADN PLASMIDIQUE CHEZ LA LEVURE

Les extractions d'ADN chez la levure ont été effectuées selon le protocole suivant : une culture de levure sélectionnée en présence d'aluminium a été mise à pousser pendant 16 heures à 30°C dans le milieu de sélection LPM liquide avec agitation. Cette culture a par la suite été centrifugée à 4000g pour une durée de 20 minutes. Le surnageant a été enlevé et les cellules resuspendues dans 0.5 ml de tampon de lyse (2% Triton X-100, 1 % SDS, 100 mM NaCl, 10mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA). Le mélange a été transféré dans un tube 1.5 ml contenant 0.3 g de micro-billes de verre lavées à l'acide (SIGMA). Un volume de 0.2 ml de phénol a été ajouté et l'ensemble a été mélangé vigoureusement pendant 2 minutes pour briser les cellules. Par la suite, une centrifugation à 14 000 rpm pour 5 minutes a été effectuée. La phase supérieure a finalement été transférée dans un nouveau tube où 2 volumes d'éthanol 95% ont été ajoutés. Le tube a été placé à -20°C pour une période de 20 minutes et centrifugé 5 minutes à 14 000 rpm pour précipiter l'ADN. Le culot a été lavé à l'éthanol 70%, séché et resuspendu dans 50 µl de tampon TE (10mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA). L'ADN obtenu a été dosé par spectrophotométrie à 260 nm et la qualité des ADN vérifiée par migration sur gel d'agarose.

CHAPITRE III

RÉSULTATS

3.1. INHIBITION DE CROISSANCE RACINAIRE DUE À L'ALUMINIUM CHEZ DIFFÉRENTES LIGNÉES DE BLÉ

Lorsque des plantules de blé sont exposées à l'aluminium, un ralentissement de croissance des racines est observé (**Figure 3.1**). Ce ralentissement est plus important pour les plantules dites sensibles que pour les plantules dites tolérantes au métal. Selon les conditions expérimentales, ce ralentissement peut aller jusqu'à un arrêt total de la croissance racinaire après 2 jours (**Figure 3.1 B**) voire 4 jours d'exposition (**Figure 3.1 A**). Cet arrêt peut être dû à un blocage des mécanismes de croissance ou à une très forte mortalité des cellules racinaires. Afin d'éviter les mécanismes génétiques de mort cellulaire, les expositions au métal des plantules étudiées dans cette thèse n'ont été réalisées que pour des temps inférieurs à 2 jours. Durant ce laps de temps, les racines des plantules ont une croissance ralentie mais continuent de croître prouvant que des mécanismes génétiques de croissance sont bien présents au niveau des apex racinaires.

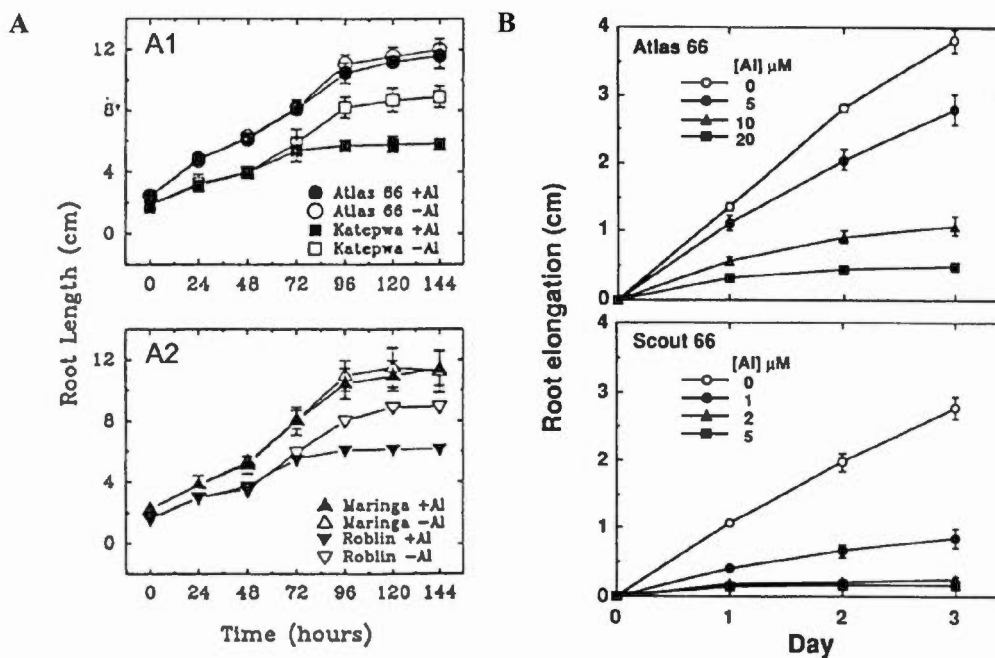


Figure 3.1 : Cinétique de la croissance racinaire de différentes variétés de blé exposées à différentes concentrations d'aluminium.

A: Deux expériences indépendantes (A1 et A2) ont conduit à exposer deux variétés tolérantes (Atlas-66 et Maringa) et deux variétés sensibles (Katepwa et Roblin) à des concentrations de $0\mu\text{M}$ et $100\mu\text{M}$ durant plusieurs heures allant de 24 à 144 heures. Les valeurs ont été obtenues pour des triplicatas avec leur écart type ($\pm\text{SE}$). (d'après Basu *et al.*, 1994a).

B: La variété tolérante Atlas-66 et la variété sensible Scout-66 ont été exposées à différentes concentrations d'aluminium durant 1 à 3 jours. Les courbes représentent les valeurs moyennes de huit racines et leur écart type. (d'après Sasaki *et al.*, 1996).

Dans le but de déterminer les niveaux de tolérance des différentes variétés de blé disponibles au laboratoire, l'indice d'inhibition de croissance racinaire a été calculé (RGI). Des plantules des variétés Atlas-66, Fundy, OK91G106, et OK91G108 ont été exposées à 0 , 5 et $50\mu\text{M}$ d'Al durant 27 heures. Les variétés OK91G106 et OK91G108 sont issues d'un croisement entre la variété tolérante Atlas-66 et la variété sensible Century. Pour chaque variété et condition d'exposition, dix plantules ont été

utilisées afin d'évaluer l'inhibition de croissance racinaire. Chaque plantule conduisait à la mesure de trois racines, soit un total de trente mesures pour chaque variété.

Atlas-66 et la lignée iso-génique OK91G106 sont bien des variétés tolérantes : elles présentent de plus faibles indices RGI à 5 μM d'aluminium (**Figure 3.2**). A l'inverse, les variétés Fundy et OK91G108 sont des variétés sensibles puisqu'elles présentent des indices plus élevés pour cette même concentration d'aluminium. Ces résultats sont proches de ceux retrouvés dans la littérature (**Hamel *et al.*, 1998** ; **Carver *et al.*, 1993**). Cependant, dans les travaux d'Hamel et collaborateurs, les auteurs retrouvent une inhibition de croissance racinaire de 10% à 5 μM d'aluminium et 50% à 50 μM d'aluminium pour la variété tolérante Atlas-66, puis 50% à 5 μM et 70% à 50 μM pour la variété sensible Fredrick. Ces auteurs retrouvent donc des valeurs identiques entre Atlas-66 à 5 μM et Fredrick à 50 μM . Les valeurs décrites dans la **Figure 3.2** sont proches entre celle de la variété Fredrick d'Hamel *et al.*, et celles de Fundy (50% versus 50%). Par contre, les valeurs sont plus élevées dans la **Figure 3.2** que dans les travaux d'Hamel et collaborateur pour la variété Atlas-66 (70% versus 50%). Ceci peut s'expliquer par le fait que l'équipe d'Hamel *et al.* ont exposé leurs plantes durant 24 heures alors que les premières expositions réalisées dans cette thèse étaient de l'ordre de 27 heures. De nouvelles expériences d'exposition de la variété Atlas-66 durant 24 heures sont décrites dans la **Figure 3.4**. Une inhibition de 48% à 50 μM d'Al similaire aux travaux d'Hamel et collaborateur (50%) a été obtenue pour Atlas-66. De plus, des inhibitions de croissance racinaire similaires ont été obtenues entre la variété tolérante Atlas-66 exposée à 50 μM et la variété sensible Fundy exposée à 5 μM . Le temps d'exposition serait donc un paramètre important pour la détermination des indices RGI. Plus les temps d'exposition sont grands, plus l'inhibition de croissance racinaire semble marquée pour la variété tolérante Atlas-66. Le choix d'un délai maximal d'exposition de 24 heures semble requis pour obtenir des inhibitions de croissance racinaire similaires entre les variétés sensibles exposées à 5 μM et les variétés tolérantes exposées à 50 μM .

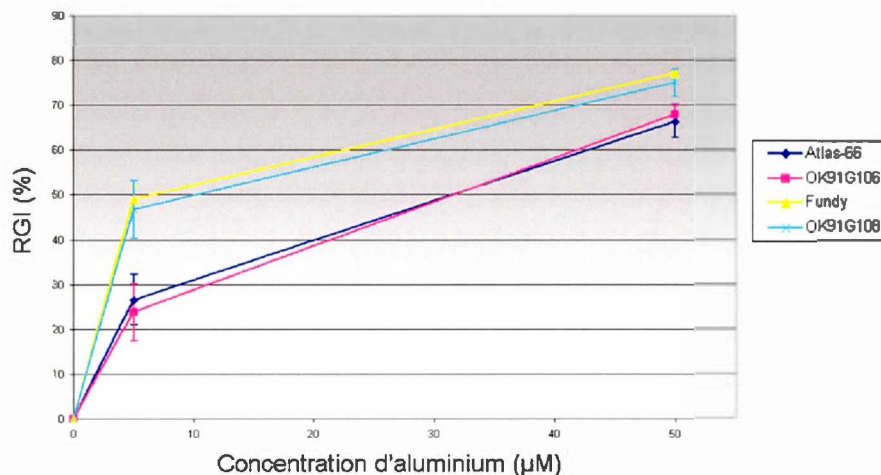


Figure 3.2 : Analyse des inhibitions de croissance racinaire de quatre variétés de blé après 27 heures d'exposition à l'aluminium.

Le calcul pour l'indice RGI a été le suivant : $(1 - (\text{croissance des plantules en présence d'Al} / \text{croissance des plantules en absence d'Al})) * 100$.

Atlas-66 et OK91G106 : variétés de blés tolérants.

Fundy et OK91G108 : variétés de blés sensibles.

Des études réalisées sur les gènes de stress *War* (*Wheat aluminum-regulated*) ont montré qu'il y avait une corrélation étroite entre les taux d'expression des gènes de stress et les inhibitions de croissance racinaires (Hamel *et al.*, 1998). Dans ces études, deux variétés de blé ont été utilisées : la variété tolérante Atlas-66 et la variété sensible Fredrick. Comme il a été précisé précédemment, des inhibitions de croissance racinaire similaires étaient observées pour la variété Atlas-66 exposée à 50 µM d'aluminium et la variété Fredrick exposée à 5 µM d'Al. A ces conditions d'inhibition de croissance racinaire identiques, les quatre gènes de stress *War* montraient des taux d'induction similaires (pistes 50 µM pour Atlas-66 et 5 µM pour Fredrick, Figure 3.3). Ainsi les blés tolérants Atlas-66 exposés à 50 µM d'Al et les blés sensibles Fredrick exposés à 5 µM d'Al semblent être dans des états de stress identiques : à ces concentrations respectives, ces deux types de blés ont des inhibitions de croissance similaires et des taux d'expression de gènes de stress

identiques. Cependant, à ces états de stress similaires, les blés Atlas-66 tolèrent dix fois plus d'aluminium (50 μM comparativement à 5 μM) que les blés Fredrick. Les plantes tolérantes Atlas-66 disposeraient donc de mécanismes qui leur permettraient de résister à la présence du métal. En comparant les gènes exprimés à 5 μM d'Al pour les variétés sensibles de blé et ceux exprimés à 50 μM d'Al pour les blés tolérants, il devrait être possible d'isoler des gènes de résistance. C'est dans cette optique que de nombreuses expositions à l'aluminium avec différentes variétés de blés ont été réalisées.

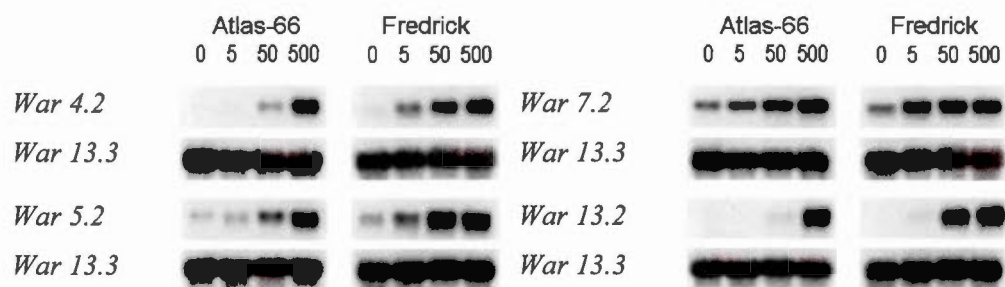


Figure 3.3 : Effets de l'aluminium sur l'accumulation des ARNm de quatre gènes *War* chez la variété Atlas-66 et Fredrick de blé.

Northern blot réalisés avec 5 μg d'ARN total extraits des pointes de racines de blé d'Atlas-66 et Fredrick exposés pendant 24 heures à 0, 5, 50 et 500 μM d'Al. Chaque membrane a été hybridée avec une sonde spécifique marquée à la radioactivité et une sonde contrôle (gène *War 13.3* codant pour la tubuline). Le gène *War 4.2* code pour une peroxidase, *War 5.2* pour une cystéine proteinase, *War 7.2* pour une phenylalanine ammonia-lyase et enfin *War 13.2* pour une oxalate oxidase (d'après Hamel *et al.*, 1998).

Un grand nombre de plantules d'Atlas-66 exposés à 50 μM d'Al et de Fundy exposés à 5 μM ont alors été utilisées pour extraire des ARN poly A⁺ afin de réaliser les banques SSH 1 et 2. L'inhibition de croissance racinaire de ces plantes exposées durant 24 heures à l'aluminium a été réévaluée (**Figure 3.4**).

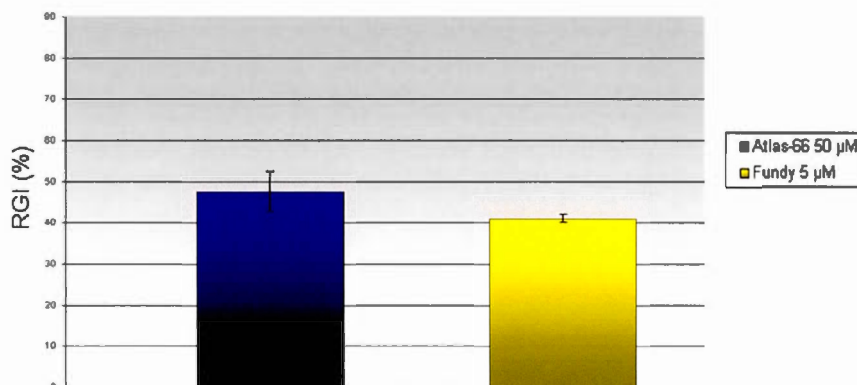


Figure 3.4 : Inhibitions de croissance racinaire obtenue après 24 heures d'exposition à l'aluminium de plantules d'Atlas-66 et de Fundy ayant servi à la réalisation des banques SSH 1 et 2.

Le calcul pour l'indice RGI a été le suivant : $(1 - (\text{croissance des plantules en présence d'Al} / \text{croissance des plantules en absence d'Al})) * 100$.

Atlas-66 : variété de blé tolérant.

Fundy : variété de blé sensible.

Des travaux récents réalisés au laboratoire ont utilisé un colorant, le Nitro Blue Tetrazolium (NBT), pour analyser la tolérance des plantules de blé (**Maltais et Houde, 2002**). Ces travaux ont mis en évidence que l'exposition des plantes à l'aluminium conduisait à une perte de la part des pointes de racines de la capacité à réduire le colorant NBT. Cependant, cette activité de réduction ré-apparaissait entre 4 et 24 heures d'exposition uniquement chez la variété tolérante Atlas-66. Ceci suggérerait la mise en place d'un processus inductible précoce chez la variété tolérante. Afin de rechercher des gènes de résistance induits de façon précoce, de nouvelles expositions de plantules ont été réalisées avec des temps d'exposition plus courts. Le blé ne faisant que de petites racines, le choix d'un nouveau temps d'exposition était limité par une taille suffisante des racines pour pouvoir estimer l'indice d'inhibition de croissance racinaire RGI. La mort cellulaire intervenant à huit heures d'exposition (**Delisle *et al.*, 2002** ; **Yamamoto *et al.*, 2001**) et une peroxydation des lipides apparaissant après douze heures (**Yamamoto *et al.*, 2001**),

un choix arbitraire de dix-sept heures d'exposition a été fait. Ce temps d'exposition se situerait au niveau de bouleversements dans la réponse des plantes à la présence de l'aluminium dans leur environnement. Les travaux récents de **Boscolo *et al.* (2003)** confirment d'ailleurs une induction de la tolérance chez le maïs tolérant Cat100-6 après 10 heures d'exposition. Les banques SSH 3, 4 et 5 ont donc été réalisées à partir d'ARN poly A⁺ extraits des variétés de blés Atlas-66 et Fundy exposées pendant 17 heures à 50 et 5 μM d'aluminium respectivement afin d'augmenter la probabilité d'isoler des gènes clés de la tolérance. Les indices RGI ont été réévalués pour l'ensemble des variétés du laboratoire, leurs ARN racinaires devant servir aux expériences d'Hybridation Suppressive Soustractive (SSH) mais aussi de Transcription Inverse avec Réaction de Polymérisation en Chaîne (RT-PCR) et Réaction de Polymérisation en Chaîne en Temps Réel (*Real-Time PCR*).

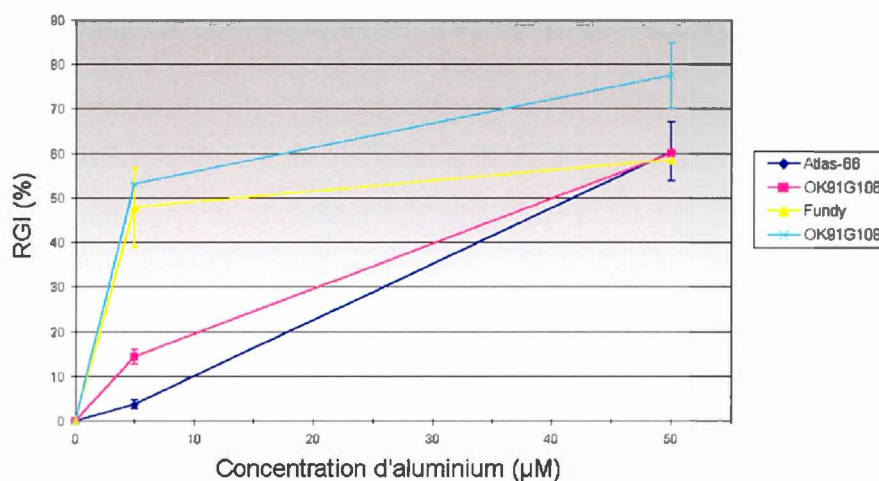


Figure 3.5 : Analyse des inhibitions de croissance racinaire de quatre variétés de blé après 17 heures d'exposition à l'aluminium.

Le calcul pour l'indice RGI a été le suivant : $(1 - (\text{croissance des plantules en présence d'Al} / \text{croissance des plantules en absence d'Al})) * 100$.

Atlas-66 et OK91G106 : variétés de blés tolérants.

Fundy et OK91G108 : variétés de blés sensibles.

Les différences de RGI entre les plantes tolérantes et sensibles sont très marquées à 5 μM pour l'expérience décrite dans la **Figure 3.5**. Des inhibitions de croissance racinaire de l'ordre de 3% et 14% sont observées pour les blés OK91G106 et Atlas-66 contre 47% et 53% pour les blés Fundy et OK91G108 respectivement. Les ARN extraits des plantules décrites dans la **Figure 3.5** ont servi à la réalisation des banques SSH 3, 4 et 5 ainsi que des expériences de RT-PCR et PCR en temps réel. Pour les banques SSH 3 à 5, seuls les ARNs des variétés Atlas-66 exposée à 50 μM d'Al (ARNm *tester*) et Fundy exposée à 5 μM d'Al (ARNm *driver*) ont été utilisés. Les valeurs de RGI pour Atlas-66 à 50 μM et Fundy à 5 μM furent respectivement : 60% et 48%. L'état de stress des plantules d'Atlas-66 semble un peu plus élevé que celui des plantules de Fundy mais cette différence a été considérée comme négligeable et les ARN de ces plantes ont été utilisés pour les banques SSH.

Afin de valider les résultats de PCR en temps réel obtenus avec les ARN extraits des expositions de plantules décrites dans la **Figure 3.5**, une deuxième série d'exposition incluant les variétés OK91G103 et OK91G107 issues d'un croisement entre Atlas-66 et la variété sensible Chisholm a été réalisée. Les expériences de PCR en temps réel réalisées à partir de ces nouveaux ARN devraient infirmer ou confirmer les résultats de la première série d'ARN extraits. Les RGI de ces nouvelles expositions de plantes sont décrites dans la **Figure 3.6** suivante afin d'évaluer l'état de stress des plantules.

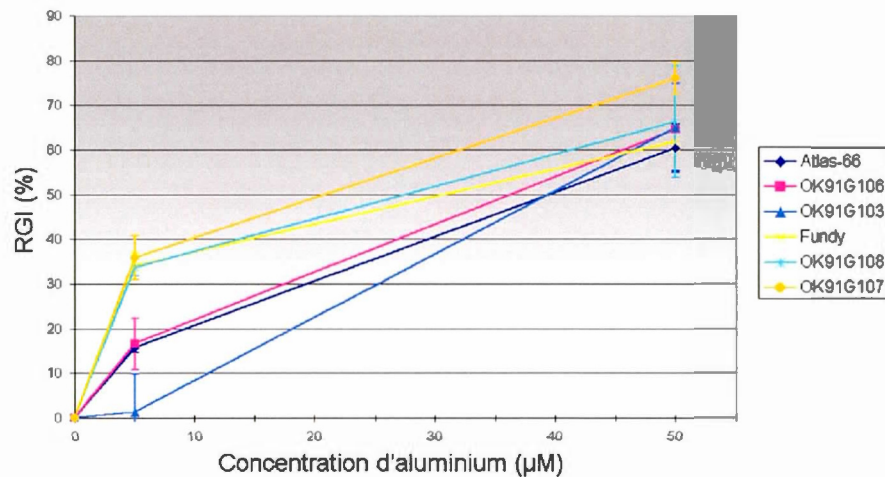


Figure 3.6 : Analyses des inhibitions de la croissance racinaire de six variétés de blé après 17 heures d'exposition à l'aluminium.

Le calcul pour l'indice RGI a été le suivant : $(1 - (\text{croissance des plantules en présence d'Al} / \text{croissance des plantules en absence d'Al})) \times 100$.

Atlas-66, OK91G106 et OK91G103 : variétés de blés tolérants.

Fundy, OK91G108 et OK91G107 : variétés de blés sensibles.

Un tassement des valeurs à 5 µM d'aluminium est observé : la croissance des racines des variétés sensibles est moins inhibée (seulement à 35% au lieu des 50% précédents de la **Figure 3.5**). Les variétés tolérantes montrent des valeurs identiques à celles observées précédemment : entre 1 à 16%. Le problème de variabilité et de reproductibilité des expériences d'exposition au métal apparaît très clairement ici. Ce problème est très souvent rencontré par les scientifiques travaillant sur l'aluminium et les plantes (**Delhaize et al., 2001**).

3.2. BANQUES SSH

Les gènes de tolérance exprimés chez les plantes résistantes peuvent être de trois natures :

- (i) des gènes spécifiques des variétés tolérantes
- (ii) des gènes présents chez les variétés tolérantes et sensibles mais régulés de façon différentes
- (iii) des isoformes de gènes dont celles présentes dans les variétés tolérantes confèreraient la résistance au métal

Afin de répondre aux deux premières hypothèses, la technique d'Hybridation Suppressive Soustractive (SSH) a été utilisée. Une première banque SSH, SSH 1, a été réalisée en utilisant les ARN de blés Atlas-66 exposés à 50 μM et ceux de blés Fundy exposés à 5 μM durant 24 heures décrits dans la **Figure 3.4**.

3.2.1. BANQUES SSH 1 ET 2

La SSH étant reconnue comme une technique pouvant générer entre 5% et 99% de clones faux-positifs (**Diatchenko *et al.*, 1998**), 100 clones ont été analysés avec des ADNc d'Atlas-66 exposé à 50 μM d'aluminium pour évaluer leur expression. Plus d'une dizaine de clones d'expression variable ont alors été utilisés pour obtenir des sondes de *northern blot*. Aucun gène testé ne montrait une différence de signaux entre les ARN des blés tolérants et sensibles (**Figure 3.7**). Ces clones représentaient aussi bien des gènes très abondants (clone 1) que des gènes relativement moins abondants (clone 83).

Environ 2700 clones de la banque SSH 1 ont alors été analysés à l'aide d'ADNc radioactifs issus des ARN totaux des blés Atlas-66 et Fundy exposés respectivement à 50 μM et 5 μM d'Al. Aucun gène d'intérêt n'a pu être retenu. De plus, la majorité des clones montrait de forts signaux aussi bien avec les ADNc d'Atlas-66 que ceux de Fundy (**Figure 3.8**, photo de gauche) laissant supposer que la banque SSH 1 était exclusivement composée de gènes abondants communs aux *tester* (Atlas-66) et *driver* (Fundy).



Figure 3.7 : Films d'autoradiographie de test *northern blot* réalisés à partir des inserts des clones 1, 2 et 83.

Pistes 1 et 2 : 12 μg d'ARN de blé Atlas-66 exposé à 50 μM d'Al ont été déposés sur le filtre ; pistes 3 et 4 : 12 μg ARN de blé Fundy exposé à 5 μM d'Al ont été déposés sur le filtre. Photo de gauche, centrale et de droite : inserts des clones 1, 2 et 83 utilisés respectivement comme sonde.

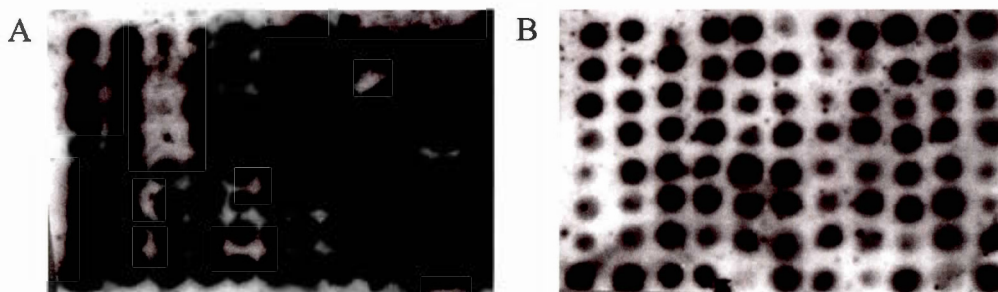


Figure 3.8 : Comparaison des signaux d'hybridation d'ADNc de Fundy sur les membranes des banques SSH 1 et 2.

Les membranes ont été réalisées à partir de 96 clones pris au hasard des banques SSH 1 et SSH 2. Les membranes figurant ici sont représentatives de toutes les membranes réalisées pour chacune des banques SSH (soit environ une trentaine de membranes pour chaque banque).

A : membrane prise au hasard de la banque SSH 1. B : membrane prise au hasard de la banque SSH 2.

Les membranes ont été hybridées avec des ADNc marqués à la radioactivité du blé Fundy exposés à 5 μ M d'Al et durant des temps d'exposition identiques. Une forte diminution de l'intensité des signaux est observée entre les membranes de la banque SSH 2 comparativement à celles de la banque SSH 1. De plus, le nombre de clones présentant de faibles signaux ou pas de signaux a augmenté entre la banque SSH 1 et la banque SSH 2. Cette même diminution de signaux a été observée entre les membranes des banques SSH 1 et SSH 2 lorsqu'elles étaient hybridées avec les ADNc marqués à la radioactivité de blé Atlas-66 exposés à 50 μ M d'Al. Des profils de membranes identiques à ceux de Fundy étaient observés.

Selon les nouveaux procédés de Suppression PCR exposés dans la section **Matériels et Méthodes**, différentes conditions d'ajout d'ARN ont été testées. Les produits PCR de SSH ainsi obtenus sont décrits dans la **Figure 3.9**. La banque SSH 2 est issue de la dernière condition expérimentée. En comparant les profils de PCR nichée sur le gel d'agarose 3% entre les banques SSH 1 et SSH 2, il est possible de constater la disparition de bandes majeures à 650 pb et aux alentours de 500 pb et l'apparition de bandes aux alentours de 150 et 200 pb. Le fait d'ajouter des ARN dans les réactions PCR a provoqué une redistribution des molécules amplifiées. De plus, une diminution du nombre de gènes communs abondants a été confirmé par

l'hybridation d'ADNc marqués (**Figure 3.8**, photo de droite). Sur cette figure, il est possible de constater que les clones de la banque SSH 2 présentent des signaux plus faibles que ceux de la banque SSH 1 et que le nombre de clones présentant de faibles signaux ou aucun signal a augmenté.

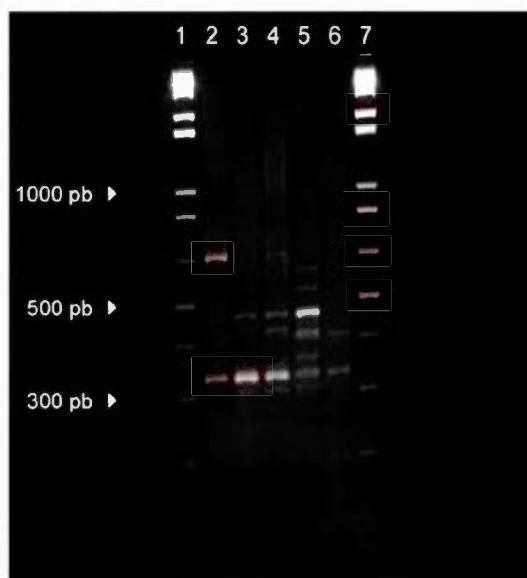


Figure 3.9 : Gel des produits de PCR nichée de différentes conditions d'ajout d'ARN lors des étapes de PCR SSH.

Pistes 1 et 7 : marqueur ; 2 : Banque SSH 1 ; 3 : addition de 500 ng d'ARNm durant les étapes de PCR et PCR nichée ; 4 : addition de 500 ng d'ARNm durant l'étape de PCR seulement ; 5 : addition de 500 ng d'ARNm durant la PCR et 500 ng ARNm + 9 μ g d'ARN totaux durant la PCR nichée ; 6 : Banque SSH 2, addition de 500 ng d'ARNm + 10 μ g d'ARN totaux durant les réactions PCR et PCR nichée.

Environ 2400 clones de cette 2^{ème} banque SSH ont été analysés. Plus d'une dizaine de clones présentant une variation de signal entre les ADNc de la variété Fundy exposée à 5 μ M d'Al et ceux de la variété Atlas-66 exposée à 50 μ M d'Al ont été testés par *northern blot* mais sans succès : ces gènes n'étaient pas différenciellement exprimés comme pour ceux de la **Figure 3.7**. Les 100 clones ne

présentant pas de signaux sur les 2 400 clones testés (clones considérés comme très faiblement exprimés), même pour des temps d'exposition sur film d'autoradiographie très longs (10 à 15 jours) ont alors été remis en culture et 5 μg de leur ADN plasmidique ont été déposés sur un filtre pour y être re-hybridés avec les ADNc totaux du *tester* et du *driver*. Environ 40% des clones représentaient des gènes abondants (**Figure 3.10**). Ceci peut s'expliquer par le fait que les bactéries possédant ces plasmides s'étaient difficilement multipliées lors de la première mise en culture. De plus, un séquençage partiel de ces clones a révélé que la majorité d'entre eux codaient pour des ARN ribosomiques mettant en évidence la basse qualité des ARN poly A⁺ et/ou la faiblesse du rendement de la SSH. En effet, la SSH est supposée éliminer de tels ADNc communs aux deux populations *tester* et *driver*. Parmi les 60 clones restants, un séquençage partiel a mis en évidence que 70% d'entre eux codaient pour des ARN ribosomiques mitochondriaux. En fait, la présence d'ARN ribosomiques mitochondriaux parmi les clones à plus faibles signaux pourrait constituer une sorte de bruit de fond des gènes plus faiblement exprimés et soulignerait à nouveau la faible efficacité de soustraction des SSH standards.

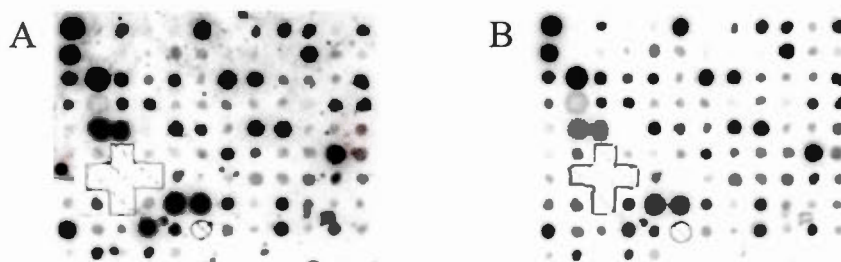


Figure 3.10 : Nouvelle analyse *dot blot* des 100 clones ayant montré de faibles signaux dans le criblage de la banque 2.

A : film d'autoradiographie obtenu avec les ADNc du *tester* marqués à la radioactivité
 B : film obtenu avec les ADNc du *driver* marqués.

Malgré la faible efficacité de la technique SSH, ces analyses de séquences ont permis d'isoler 6 clones qui présentaient des homologies avec des gènes potentiellement intéressants. Ces homologies portaient sur une protéine d'hypersensibilité d'orge, une calnexine de maïs, un transporteur hypothétique d'oligo-peptide proton dépendant de riz et une protéine de fonction inconnue (**Tableau 3.1**).

Tableau 3.1 : Homologies de séquence des gènes isolés par SSH.

Noms des clones	Taille de l'insert	Gène homologue	Homologie et e-value
48E8 44E2 45D10	303 pb	protéine d'hypersensibilité d'orge	94% ; e^{-125}
49A1	302 pb	transporteur hypothétique d'oligo-peptide proton dépendant annoté sur le chromosome 10 du riz	89% ; $5e^{-27}$
49G9	331 pb	Calnexine de maïs	87% ; $4e^{-88}$
45C2	105 pb	Protéine de fonction inconnue de maïs	88% ; $3e^{-18}$

Le gène 48E8 coderait pour une protéine intervenant dans la réponse d'hypersensibilité des plantes, une réaction de défense des plantes contre les attaques de pathogènes. Ce serait donc un gène de stress. Le gène 48E8 pourrait être impliqué dans des voies communes à différents stress. En effet, l'aluminium est reconnu pour induire l'expression de gènes communs à différents stress biotiques et abiotiques (Snowden et Gardner, 1993 ; Richards *et al.*, 1994 ; Ezaki *et al.*, 1995 ; Ezaki *et al.*, 1996 ; Cruz-Ortega *et al.*, 1997 ; Ezaki *et al.*, 1997 ; Richards *et al.*, 1998 ; Hamel *et al.*, 1998 ; Milla *et al.*, 2002 ; Sasaki *et al.*, 2002a ; Watt, 2003). De plus, le fait que le gène 48E8 soit homologue à une protéine d'orge, une céréale très sensible à l'aluminium, renforcerait l'idée que ce gène serait plus un gène de stress qu'un gène de tolérance. Ce gène est retrouvé trois fois sur 2400 clones. La séquence entière de ce gène a été recherchée grâce aux stratégies RACE décrites dans le **Chapitre 2 : Matériels et Méthodes**. La séquence de son ADNc et de la protéine traduite qui en découle sont décrites dans la **Figure 3.11**.

A GCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGCCCGACGTCGCATGCTCCCGGCCG
 CCATGGCGGCCGCGGGAATTCGATTCAACC**GACTGGAGCACGAGGACACTGACATGGACTGAAGA**
AGTAGAAAGACGAAGCCAACCCATCCAAGCGGCAGCAGAGCAGACGGCCGGCGACGAACCAATCC
 AGCCAGCCGAACCTCGTCAGCGCGCAGCCGCCCTTCCCGCGAGATAAACC**ATGGGTGGGGTACTTG**
 GTTTGATACAGATTGATCAATCAACAGTAGCCATCAAGGAGACTTTTGGGAAGTTTGATGCGATC
 CTGCAACCTGGATGCCACTGCTTGCCATGGTGCCTAGGGCAGCAGATTGCTGGATATCTTTCTCT
 GCGTGTGCAGCAGCTTGACGTCCGATGCGAAAACCAAGACCAAGGATAAATGTCTTTGTCAACGTTG
 TGGCATCTGTGCAGTACCGTGCTCTTGCTGACAAGGCATCTGATGCCTTTTACAGGCTTAGCAAC
 ACCAGGGAGCAAATCCAGTCCATGCTTTGATGTGATCAGGGCTAGCGTTCCAAAGATGAACTT
 GGATGATGTATTTGAGCAGAAGAAATGAAATAGCAAGGGCTGTGGAGGATGAGCTTGAAAAGGCAA
 TGTCTGCCTACGGGTACGAGATTGTGCAAACTCTGATGTTGATATTGAGCCAGATGAACATGTG
 AAGAGAGCCATGAATGAGATCAATGCAGCTGCTAGGATGAGGTTGGCAGCCACTGAGAAAAGCCGA
 GCGGAAAAGATTCTGCAGATCAAGAGGGCTGAAGGTGAGGCAGAATCGAAATACTTGGCTGGTG
 TGGGTATTGCAAGGCAGCGCCAGGCCATAGTGGACGGGCTGAGAGACAGTGTCTCGCCTTCTCT
 GAGAAATGTGCCCTGGGACCTCTTCGAAGGATGTCATGGATATGGTTTTGGTGACCCAGTACTTCCA
 TACCATGAAGGACATTGGGGCCTCTTCCAAGTCTTCAGCAGTGTTCATCCCTCACGGGCCTTGGCG
 CTGTCAAAGACATCGCTACGCAGATACGAGATGGTCAGCTCCAGGGCAGGATGGTTTGAGGAGTG
 TTGAAAATGGATGCCACTTTTATATGCATACTTTTAAGTACATACAGCTTATTCTTATACTATG
 TGTGAGGTGAGGTGAGGTTGTGCC TAGATGGATGTTAATATCAGTACTTGCTTGGGTTGTGCAAC
 GCGTATCTGTAAAAAATATCAGTTGTGCTATCAGTGTGTTGCAACTATCTGTGAATTGAGAGTG
 TTATATGTTACT**AAAAAAAAAAAAA****CACTGTCTATGCCGTTACGTAGCGTATCG**

B MGGVLGLIQIDQSTVAIKETFGKFDAILQPGCHCLPWCLGQQIAGYLSLRVQQLDVRCEKTKDN
 VFNVVASVQYRALADKASDAFYRLSNTREIQSYVFDVIRASVPKMNLDVFEQKNEIARAVED
 ELEKAMSAYGYEIVQTLIVDIEPDEHVKRAMNEINAAARMRLAATEKAEAEKILQIKRAEGEABS
 KYLAGVGIARQRQAIVDGLRDSVLAFFSENVPGTSSKDVMDMVLVTQYFDTMKDIGASSKSSAVFI
 PHGPGAVKDIATQIRDGQLQGRMV*

Séquence du vecteur pGEM-T

[Séquence GeneRacer 5' Primer](#)

[Séquence GeneRacer RNA Oligo](#)

[Séquence GeneRacer OligodT](#)

[Séquence GeneRacer 3' Primer](#)

[Site d'initiation de la traduction](#)

Figure 3.11 : Séquence du gène 48E8 obtenue par GeneRacer et de la protéine traduite.

En A, la séquence du gène 48E8 obtenu par GeneRacer. En B, la séquence traduite en acides aminés.

Le fragment de gène 49A1 présentait une forte homologie pour un élément BAC du chromosome 10 du riz (numéro d'accension AE017085). L'annotation mettait en relief un gène de 1656 pb qui coderait pour une protéine de 551 acides aminés (numéro d'accension AAP53384). Cette protéine est proposée comme étant un transporteur d'oligo-peptide proton dépendant.

Le clone 49G9 contiendrait un fragment de gène codant pour une calnexine. Les calnexines sont des protéines chaperonnes qui fixent un sucre en N-terminal des oligo-peptides au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique. Elles participent à la maturation des protéines.

Le fragment de gène 45C2 code pour une protéine de fonction inconnue. Les séquences partielles en nucléotides obtenues à partir des clones 49A1, 49G9 et 45C2 sont données dans l'**Appendice A.2**.

Ces gènes ont été testés par RT-PCR et/ou PCR en temps réel et seul le gène 49A1 présentait une sur-expression suite à une exposition au métal. Les études d'expression de ce gène 49A1 sont décrites dans la section 3.3 suivante.

3.2.2. BANQUES SSH 3, 4 ET 5

Le niveau de bruit de fond lors d'expérience de SSH est reconnu être dépendant de trois facteurs (**Diatchenko *et al.*, 1998 ; Desai *et al.*, 2000**) :

- (i) la qualité des ARN de départ
- (ii) le rendement de la soustraction
- (iii) et principalement du choix des populations de *tester* et *driver*

Les auteurs de la SSH soulignent que, plus les populations de *driver* et *tester* sont très proches génétiquement, c'est-à-dire qu'il existe peu d'ARNm exprimés différemment entre elles, plus le bruit de fond sera élevé (**Desai *et al.*, 2000**). Cependant, dans le but d'isoler des gènes de tolérance à l'aluminium, ce paramètre ne pouvait être changé et se heurte au faible nombre estimé (1 à 2) de gènes majeurs responsables de la tolérance à l'aluminium chez le blé. Seuls la qualité des ARN (i), notamment leur enrichissement en ARN poly A⁺ et le rendement de la soustraction (ii) pouvaient être améliorés. Les auteurs de la SSH s'entendent pour dire que la SSH

normalise plus qu'elle ne soustrait (**Diatchenko et al., 1998**). Cette affirmation ne s'accorde pas avec l'idée de soustraction théorique de la technique et laisse en suspens un problème technique inhérent à la SSH.

La qualité des ARN de départ étant un paramètre crucial, de nouvelles banques SSH ont été réalisées à partir d'ARN totaux enrichis en ARN poly A⁺ pour tenter d'isoler des gènes d'intérêt supplémentaires. Pour ce faire, une meilleure qualité des rendements des chromatographies sur colonne d'oligo-dT a été recherchée. Ainsi, environ 1 mg d'ARN des blés Atlas-66 et Fundy exposés respectivement à 50 et 5 µM d'Al ont été utilisés. Trois cycles de chromatographie ont pu être réalisés et ont permis de récupérer 4 µg d'ARN totaux enrichis en ARN poly A⁺ pour chaque condition. Les nouvelles banques obtenues, SSH 4 et 5, ont été réalisées à partir de nouveaux procédés de Suppression PCR dont les efficacités sont décrites dans la section **3.2.3** suivante.

Environ 1200 clones des banques 4 et 5 ont été analysés par *colony blot*. Cependant, aucun signal n'était observé lorsque les membranes étaient hybridées avec les ADNc marqués des blés Atlas-66 exposés à 50 µM d'Al ou Fundy exposés à 5 µM d'aluminium même après des temps longs d'exposition (10 à 15 jours) des membranes avec un film d'autoradiographie. Ainsi, l'enrichissement en ARN poly A⁺ et l'utilisation des nouveaux procédés de Suppression PCR a éliminé le problème des clones abondants qui constituaient le bruit de fond des banques SSH 1 et 2. Cependant, un nouveau problème s'est alors présenté : comment analyser l'expression différentielle des fragments de gènes de ces nouvelles banques puisque aucun signal n'était obtenu avec les conditions de marquage d'ADNc d'ARN totaux. Une possibilité était d'utiliser les produits PCR de la SSH et de la SSH réciproque (*tester* utilisé comme *driver* et *driver* utilisé comme *tester*). Cependant, un tel procédé a le désavantage de ne révéler que des signaux de "présence/absence" de gènes plutôt que des signaux d'expression différentielle (**Desai et al., 2000**). De plus, les

amplifications PCR n'étant pas identiques d'une SSH à l'autre, de nombreux faux-positifs peuvent se retrouver favorablement amplifiés et vont passer pour des vrais-positifs lors des criblages différentiels (Desai *et al.*, 2000). Une autre source a donc été préférée : il s'agit des produits PCR issus du kit GeneRacer d'INVITROGEN. Ces produits correspondent à plus de 90% à des ARNm. Tout en conservant une certaine proportionnalité des gènes par des PCR GeneRacer contrôlées, ces produits PCR marqués à la radioactivité ont été utilisés comme sondes (Figure 3.12).

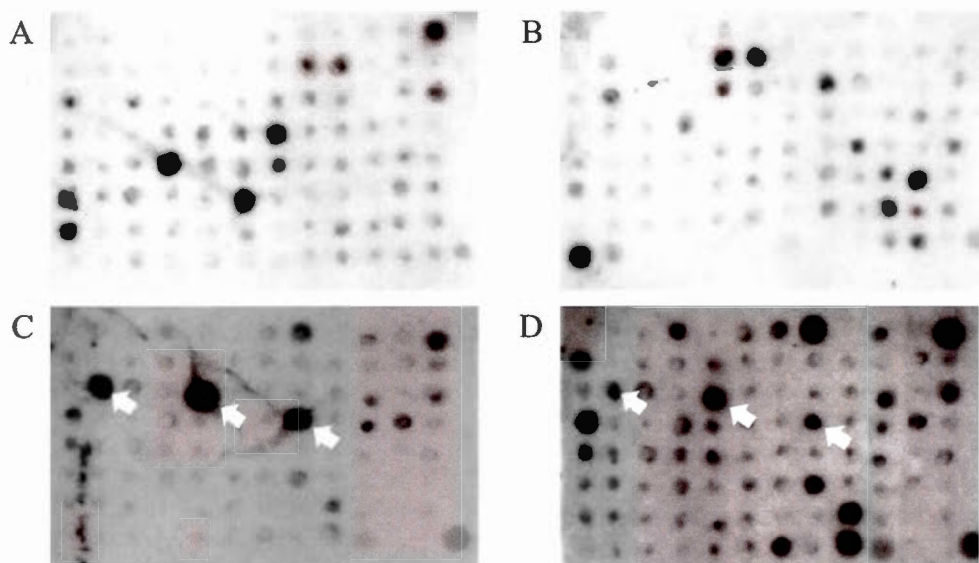


Figure 3.12 : Autoradiographies de membranes des banques SSH 3, 4 et 5 sondées avec des produits GeneRacer.

A : membrane 4 de la banque 3 sondée avec les produits GeneRacer de Fundy

B : membrane 5 de la banque 4 sondée avec les produits GeneRacer de Fundy

C : membrane 10 de la banque 5 sondée avec les produits GeneRacer d'Atlas-66

D : membrane 10 de la banque 5 sondée avec les produits GeneRacer de Fundy

Les flèches indiquent des clones ayant montré des différences de signaux et ayant été testés par *northern blot*.

Cinq clones montrant des signaux de surexpression chez Atlas-66 (**Tableau 3.2**) ont été testés par *northern blot* mais aussi par PCR en temps réel. Malheureusement aucun d'entre eux n'a été validé comme gène différentiellement exprimé. Les variations de signaux étaient toutefois très claires (photographies C et D, **Figure 3.12**) suggérant qu'une variabilité d'amplification des gènes à partir du kit GeneRacer aurait lieu : tous les gènes n'étaient pas amplifiés de la même façon pour deux réactions du kit différentes. De plus, 80% des clones ne présentaient toujours pas de signaux analysables chez les banques SSH 4 et 5. Ainsi, le ciblage par des produits GeneRacer ne semblait pas être une bonne approche expérimentale pour continuer le criblage des banques SSH 4 et 5 et un séquençage systématique des clones a été préféré en vue de sélectionner les gènes à tester par *northern blot* ou par PCR en temps réel.

Tableau 3.2 : Analyse de séquences de cinq clones retrouvés positifs par *colony blot*.

Noms des clones	Taille de l'insert	Gène homologue	Homologie et e-value
10C2	96 pb	Inconnu	94% ; e^{-125}
10C5 10D8	245 pb	Gène de fonction inconnue de blé	100% ; 5^{e-74}
7A10	636 pb	Gène de fonction inconnue de riz	87% ; 7^{e-70}
8A7	287 pb	Inconnu	88% ; 3^{e-18}

Les résultats des analyses de séquences sont décrits dans l'**Appendice A.2** et l'**Appendice A.3**. Une synthèse de ces résultats est donnée par le **Tableau 3.3** et le **Tableau 3.4**. Plus d'une dizaine de clones sélectionnés pour leur fonction pouvant être reliée à la résistance à l'aluminium ont été testés par *northern blot* (**Figure 3.13**). En règle générale, les clones ne montraient pas de signaux significatifs voire même une diminution de signaux pour les échantillons exposés au métal (8C02, 6E04, 5H07). Certains gènes trop faiblement exprimés ne pouvaient pas être détectés (7E12, 5D08, 5A03). Ainsi, une sélection des clones par leur fonction hypothétique ne

permettrait pas d'isoler des gènes sur-exprimés par le métal. L'analyse des banques SSH 4 et 5 se heurte donc à des expériences à grande échelle de *northern blot* ou PCR en temps réel très lourdes et fort coûteuses.

Tableau 3.3 : Répartition fonctionnelle des gènes isolés dans la banque 4.

Classification of clones according to their homology	Number of clones
METABOLISM	56
Aldehyde dehydrogenase	3
Aspartate aminotransferase	5+1
NADH dehydrogenase	2+1
Cytochrome	3
S-adenosylmethionine decarboxylase	2
S-adenosyl L-homocysteine hydrolase	2
Sucrose synthase	2
S-adenosylmethionine synthetase	2
Succinate dehydrogenase (ubiquinone reductase)	1+1
Aminolevulinate dehydratase	1
Pyrophosphatase-fructose-6-phosphate-1-phosphotransferase	1
Fructose-biphosphate aldolase	1
Mitochondrial F0 ATP synthase D chain	1
Carrier protein III	1
Lipoxygenase	1
Indole-3-glycerol phosphate lyase	1
Ascorbate peroxidase	1
Cullin (ubiquitin ligase)	1
Disulfide isomerase	1
Transaldolase	1
Cinnamyl-alcohol dehydrogenase	1
Acetyl-CoA synthase	1
Alpha-keto acid dehydrogenase	1
Dihydrofolate reductase-thymidylate synthase	1+1
Aldo/keto reductase	1
ABC transporter	1
Cathepsin B	1
UDP-glucunonyltransferase	1
Arabinogalactan protein	1
Hexose transporter	1
Beta-1,3-glucanase precursor	1

ATP citrate lyase	1
Acetyl CoA carboxylase	1
Monodehydroascorbate	1
CONSTITUTIVE	42
28S ribosomal protein	6
Endomembrane protein 70	2+1
40S ribosomal protein	4
Actin	2
Ubiquitin	5
60S ribosomal protein L21	4
Ribosomal protein L18	1+1
Acidic ribosomal protein P1a	1
Ribosomal protein L31	1
Elongation factor-1 alpha	1+1
60S ribosomal protein L23	1
60S ribosomal protein L14	1
60S ribosomal protein L34	1
60S ribosomal protein L37a	1
60S ribosomal protein L13	1
18S ribosomal protein	1
Alpha-tubulin	1
Extensin	1
40S ribosomal protein S15	1
Transcription factor HBP-1a	1
STRESS	16
Tumor suppressor / QM protein	1+3
HSP70	5+1
HSP80	2
Immunophilin	1
SMT3 protein	1
DNA damage repair protein	1
Disease resistance protein I2	1
REGULATION	33
Response regulator	3
GTP-binding protein	2
RNA binding protein	2+7+3+1
Casein kinase II alpha	2

Proteasome regulatory ATPase	2
Kinase regulator	1
U2 snRNP auxiliary factor	1
Protein kinase	1+1
Alpha-amylase inhibitor	1
F-box protein	1
AF10 protein	1
Receptor protein kinase	1+1
Amino-acid transport repressor	1
Protein phosphatase	1
UNKNOWN	142

5+1 signifie 5 clones ayant la même séquence et 1 clone présentant une autre partie de la séquence d'un même gène ou d'un gène de même fonction.

Tableau 3.4 : Répartition fonctionnelle des gènes isolés dans la banque 5.

Classification of clones according to their homology	Number of clones
METABOLISM	12
Ascorbate peroxidase	2
Aldehyde dehydrogenase	4
Cathepsin B (lysosomal cysteine protease)	2
Digalactosyldiacylglycerol synthase	1
Transaldolase	1
Glutathione S-transferase	1
ADP-ribosylation factor	1
CONSTITUTIVE	4
Alpha tubulin	1
S28 ribosomal protein	1
60S ribosomal protein L34	1
Ubiquitin	1
STRESS	3
Tumor suppressor / QM protein	1
HSP70	1
Phenylalanine ammonia lyase (PAL)	1
REGULATION	6
RNA binding protein	2+1
Origin recognition complex I	1
Casein kinase I	1
Casein kinase II alpha	1
UNKNOWN	47

5+1 signifie 5 clones ayant la même séquence et 1 clone présentant une autre partie de la séquence d'un même gène ou d'un gène de même fonction.

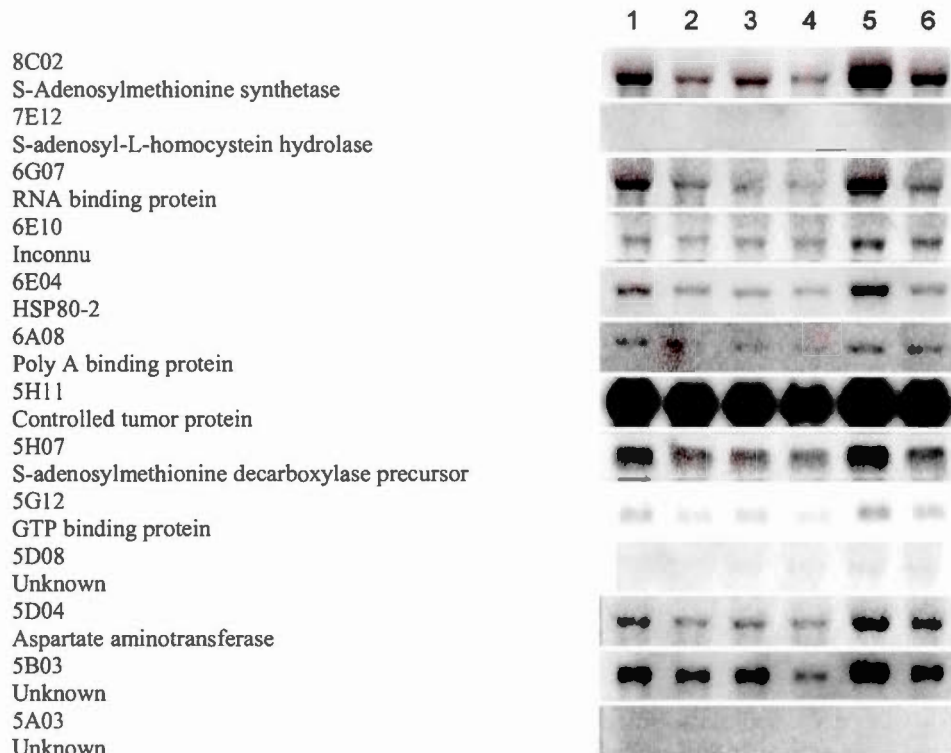


Figure 3.13: Northern blot de différents clones de la banque 4.

Pistes 1-4, 5 µg d'ARN de blé Atlas-66 exposé à 0, 5, 50 et 250 µM d'Al ; pistes 5 et 6, 5 µg d'ARN de blé Fundy exposé à 0 et 5 µM d'Al.

3.2.3. ANALYSE DES NOUVEAUX PROCÉDÉS DE SUPPRESSION PCR APPLIQUÉS À LA SSH

La **Figure 3.14** représente les profils de *colony blot* lorsque les ADNc d'ARN totaux du *tester* et du *driver* sont marqués à la radioactivité et utilisés comme sonde. Ces profils ont été identiques pour environ 1200 clones des banques SSH 3, 4 et 5. La banque 4 diffère de la banque 3 par l'utilisation du procédé de Suppression PCR par Remplissage des extrémités. Dans la banque 3, 10% des clones représentent des gènes communs abondants (faux-positifs, photo A de la **Figure 3.14**). Le taux de ces gènes abondants faux positifs est de 0% dans la banque 4 (**Figure 3.14**, panneau B).

Ainsi le procédé de Suppression PCR par Remplissage des Extrémités éliminerait les clones faux positifs de forte abondance.

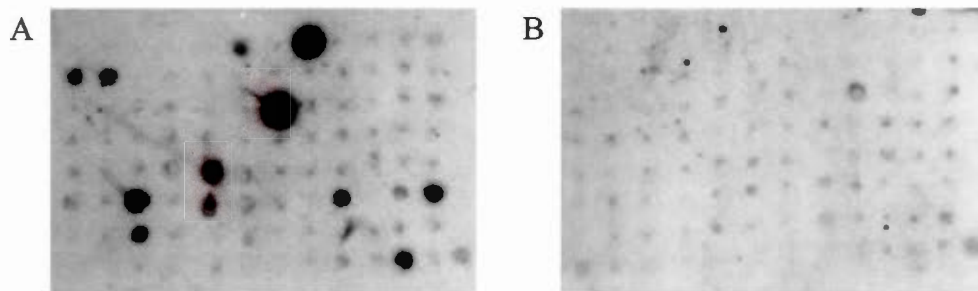


Figure 3.14 : Autoradiographie de dot blot des banques SSH 3 et 4.

A : membrane 4 de la banque SSH 3 sondée avec des ADNc d'ARN totaux de Fundy à 5 μM d' Al^{3+} (*driver*).

B : membrane 5 de la banque SSH 4 sondée avec des ADNc d'ARN totaux de Fundy à 5 μM d' Al^{3+} (*driver*).

Les mêmes photos de film sont obtenues lorsque les ADNc sont issus d'ARN totaux d'Atlas-66 exposé à 50 μM d' Al^{3+} (*tester*).

La **Figure 3.15** présente les résultats obtenus avec les amplifiats PCR nichée de différentes banques SSH. La banque 3 (piste 2) et la banque 4 (piste 4) diffèrent par l'utilisation du procédé de Suppression PCR par Remplissage des extrémités (chez la banque 4). Il apparaît tout de suite évident que des bandes majeures sont présentes chez la banque 3 mais ont entièrement disparu ou sont représentées par des bandes de plus faible intensité dans la banque 4. CLONTECH dans leur kit PCR-SelectTM cDNA Subtraction précise que les bandes majeures généralement observées dans les produits de PCR nichée de SSH représentent des gènes non-différentiellement exprimés et recommande aux utilisateurs de ne pas chercher à les cloner. Ainsi le procédé de Suppression PCR par Remplissage des Extrémités semble avoir éliminé ces amplifiats indésirables. La banque 5 (piste 5) diffère de la banque 4 (piste 4) par l'utilisation du procédé de Suppression PCR par ajout d'ARN. Aucune réelle différence de profil d'amplifiats n'est observée entre ces deux banques sur gel

d'agarose. Seule la traînée d'ARN est parfaitement visible pour la banque 5 suite à leur ajout durant les étapes d'amplification PCR.

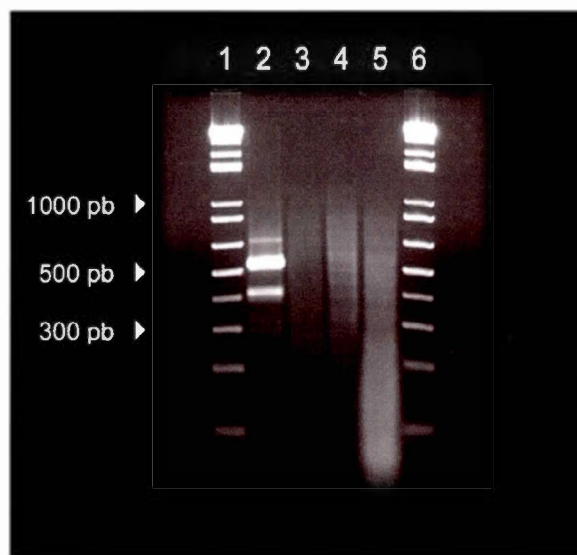


Figure 3.15 : Gel comparatif des produits PCR nichée des banques 3, 4 et 5.
Pistes 1 & 6 : marqueur de taille moléculaire ; 2 : amplifiats de la banque 3 ; 3 : amplifiats de la banque non-soustraite ; 4 : amplifiats de la banque 4 ; 5 : amplifiats de la banque 5.

Cependant, des analyses ont permis de mettre en évidence une amélioration apportée par ce nouveau procédé de Suppression PCR avec ajout d'ARN. Un test PCR a permis de déterminer l'abondance de trois gènes : le gène de l'oxalate oxydase (Oxo) qui se retrouve induit chez Atlas-66 et Fundy lors d'une exposition à l'aluminium pour une RGI de 50% (**Figure 3.3**); le gène 48E8 retrouvé de façon ubiquitaire mais qui est un gène très faiblement exprimé ; enfin le gène 49A1 qui est le seul gène différenciellement exprimé isolé par SSH mais qui est aussi un gène très faiblement induit. Les résultats de ces PCR sont rapportés sur la **Figure 3.16**. Il est à noter que la banque non-soustraite (sorte de SSH sans *driver*, piste 3) représente en fait tous les gènes présents chez le *tester*. Le gène Oxo moyennement abondant chez

le *driver* (piste 3, l'illumination aux UV a été diminuée comparativement à 48E8 et 49A1 pour avoir un signal convenable) a bien été soustrait dans les banques 3, 4 et 5 (pas de bande dans les pistes 2, 4 et 5). Il en est de même pour le gène très faiblement exprimé 48E8. Par contre, pour le gène 49A1, un enrichissement important apparaît dans la banque 4 (piste 4) alors que dans la 3 une très faible présence est détectée (piste 2). La banque 5 montre une présence du gène moindre par rapport à la banque 4 mais bien supérieur à la banque 3 (piste 5). Cette différence entre la banque 4 et 5 laisse supposer que finalement l'ajout d'ARN en excès aurait bel et bien réduit l'amplification du gène 49A1 puisque ce gène est aussi présent chez Fundy exposé à 5 μ M mais 2 à 6 fois moins que chez Atlas-66 exposé à 50 μ M d'Al. Pour confirmer l'enrichissement du gène 49A1 dans les banques 4 et 5, le fragment de gène a été utilisé comme sonde pour cribler des filtres sur lesquels l'ADN de clones des banques 3, 4 et 5 a été fixé (*colony blot*). Le gène 49A1 est un gène si faiblement exprimé que des études statistiques par *colony blot* ont été impossibles : sur 500 000 clones, le gène n'était retrouvé que de 0 à 1 fois.

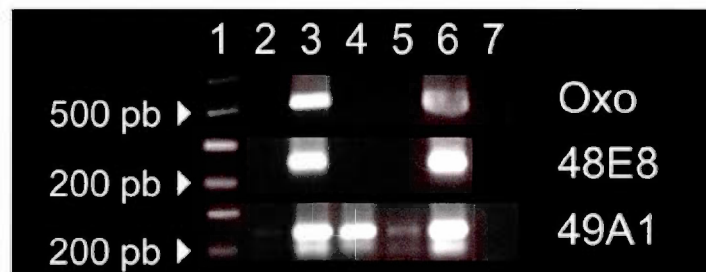


Figure 3.16 : Tests PCR de la qualité des banques SSH.

La figure représente des gels d'1% d'agarose où des produits PCR spécifiques de 3 gènes (Oxalate oxydase, 48E8 et 49A1) ont été déposés.

Piste 1 : marqueur de taille moléculaire ; 2 : produits de PCR réalisée à partir des amplifiats de la banque SSH 3 ; 3 : produits de PCR réalisée à partir des amplifiats d'une banque SSH sans soustraction ; 4 : produits de PCR réalisée à partir des amplifiats de la banque SSH 4 ; 5 : produits de PCR réalisée à partir des amplifiats de la banque SSH 5 ; 6 : contrôles positifs des tests (plasmide dilué contenant la séquence d'un des 3 gènes) ; 7 : contrôles négatifs des tests (eau).

Des analyses de séquences ont aussi été réalisées sur les clones de ces différentes banques. L'analyse des séquences de 289 clones de la banque 4 et de 72 clones de la banque 5 montre une faible présence de gènes constitutifs généralement considérés comme des faux-positifs (*background*) (**Figure 3.17**). Les résultats de la **Figure 3.17** sont issus de l'analyse des séquences des clones présentée dans **Appendice A.2** et **Appendice A.3**. Environ 15% de gènes constitutifs sont isolés dans la banque 4 contre 6% seulement dans la banque 5. Dans les conditions standard de SSH (banque 1 et 2), ce chiffre pouvait dépasser les 90%. Ainsi une réelle efficacité des nouveaux protocoles de Suppression PCR est observée. De plus, le procédé de Suppression PCR avec ajout d'ARN apporte une amélioration puisque le pourcentage de gènes constitutifs passe de 15 à 6 entre les banques SSH 4 et 5. La très forte présence de gènes inconnus (49 à 65%) met en évidence une normalisation importante. L'analyse dans les banques de données d'EST a confirmé que tous ces gènes étaient issus du blé et non d'une contamination éventuelle.

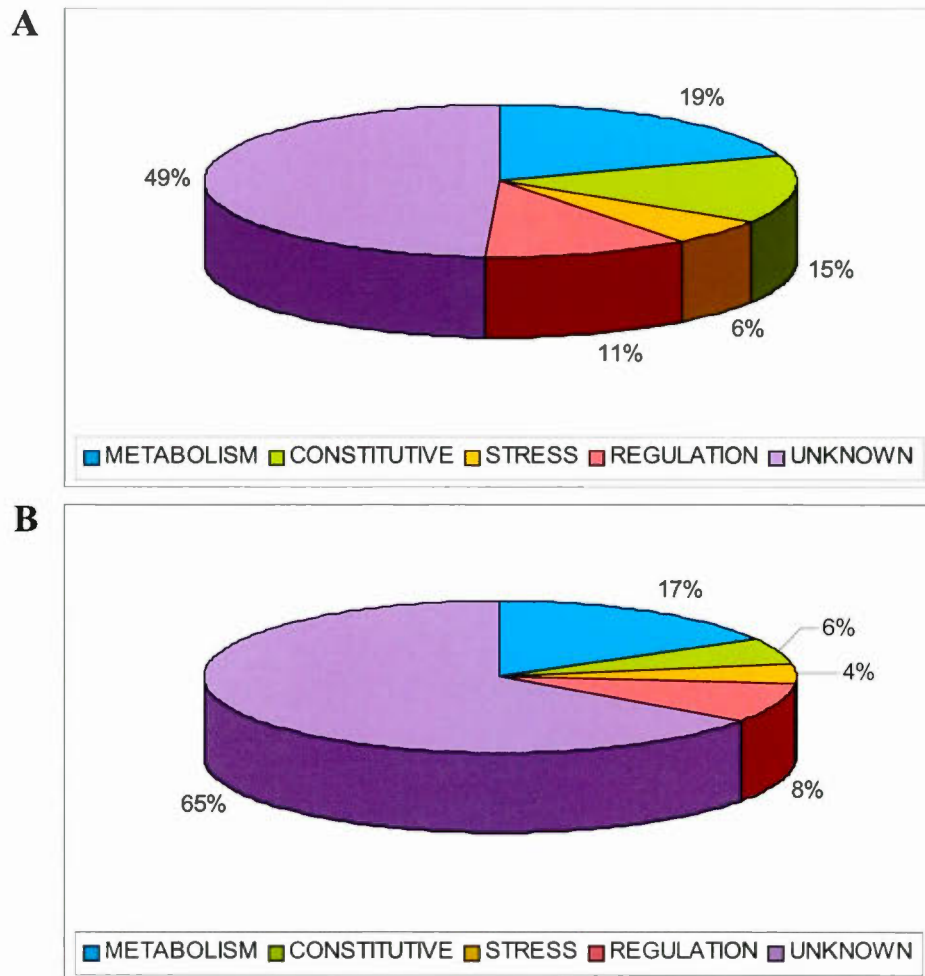


Figure 3.17 : Comparaison de la répartition fonctionnelle des gènes identifiés par SSH.

A : Répartition fonctionnelle de la banque 4. B : Répartition fonctionnelle de la banque 5.

3.3. 49A1, GÈNE DE TOLÉRANCE?

3.3.1. EXPRESSION DIFFÉRENTIELLE DU GÈNE 49A1

L'étude de l'expression des gènes 48E8 et 49A1 n'a pu être réalisée par *northern blot* : aucun signal n'était observé par cette technique. Ces gènes étaient trop faiblement exprimés. Des expériences de RT-PCR ont alors été réalisées et sont rapportées dans la **Figure 3.18** suivante :

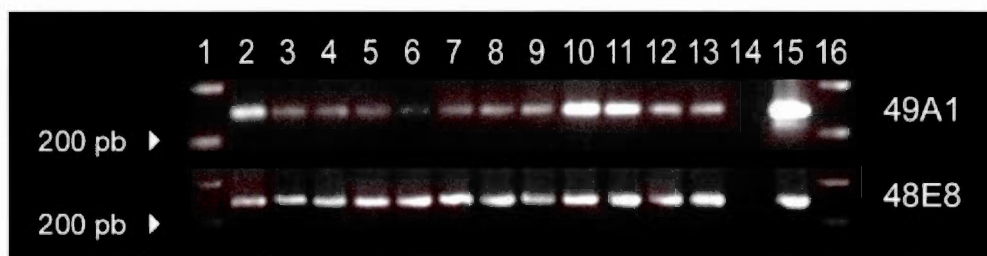


Figure 3.18 : RT-PCR des gènes 48E8 et 49A1.

La figure représente des gels d'1% d'agarose où des produits RT-PCR spécifiques de 2 gènes (48E8 et 49A1) ont été déposés.

Pistes 1 & 16 : marqueur

Pistes 2 à 5 : RT-PCR effectuée à partir des ARNm des blés Atlas-66, OK91G106, Fundy et OK91G108 exposés à 0 μM

Pistes 6 à 9 : RT-PCR effectuée à partir des ARNm des blés Atlas-66, OK91G106, Fundy et OK91G108 exposés à 5 μM

Pistes 10 à 13 : RT-PCR effectuée à partir des ARNm des blés Atlas-66, OK91G106, Fundy et OK91G108 exposés à 50 μM

Piste 14 : contrôle négatif (eau) ; piste 15 : contrôle positif (plasmide dilué contenant la séquence du gène 49A1 ou 48E8).

Le gène 48E8 est exprimé de façon ubiquitaire : il est retrouvé à des niveaux similaires chez tous les types de blés exposés aux trois concentrations d'aluminium (0, 5 et 50 μM). Le gène 48E8 ne semble donc pas être impliqué dans la réponse à l'aluminium. Ce gène coderait pour une protéine de réponse d'hypersensibilité. Puisque ce gène ne semble pas être dérégulé par l'aluminium, le stress causé par la

présence d'aluminium et la réponse d'hypersensibilité apparaissent comme deux mécanismes n'interagissant pas entre eux.

Le gène 49A1 présente des signaux pour toutes les conditions mais des signaux plus intenses pour les blés tolérants Atlas-66 et OK91G106 exposés à 50 μM d'Al. Le gène 49A1 serait donc exprimé de façon basale mais une induction plus élevée se produirait pour les blés tolérants exposés à de fortes concentrations de métal. Afin de valider l'expression différentielle du gène 49A1, des expériences de PCR en temps réel ont été réalisées. Les ARN ont été dosés par une autre méthode (RiboGreen, MOLECULAR PROBE) plus fiable que le simple dosage par densité optique et ont été utilisés pour effectuer une transcription inverse et une PCR en temps réel comme décrites dans le **Chapitre 2 : Matériels et Méthodes**. Le gène de référence utilisé a été celui de la Glycéraldéhyde-3-Phosphate Deshydrogénase (GA_3PDH) cytosolique.

Les données des expériences de PCR en temps réelles sont visualisées sous forme de courbes (**Figure 3.19**). Ensuite, une ligne de base est choisie afin de lire les données : à chaque fois que cette ligne de base (droite horizontale verte sur la **Figure 3.19**) croise une courbe choisie, un numéro relatif de cycle d'amplification PCR correspondant est donné ou C_T . Une ligne de base de 0,2 a été utilisée selon les conditions proposées par le constructeur de la machine PCR (ABIprism). Une valeur de C_T a été générée pour chaque courbe croisant la ligne de base. Ainsi pour chaque gène chez une variété donnée et à une condition d'exposition au métal donnée, il était possible d'exprimer les valeurs numériques obtenues sous la forme : $\text{moy}C_T \pm dC_T$ où $\text{moy}C_T$ représente la moyenne des C_T des duplicata et dC_T représente l'écart-type. De ces valeurs de C_T il est alors possible de déterminer une quantité relative des ARNm du gène 49A1 comparativement à ceux du gène GA_3PDH . Ces quantités relatives pour les ARNm du gène 49A1 ont été déterminées une première fois pour quatre variétés de blé (**Tableau 3.5**) puis une deuxième fois pour six variétés de blé

(Tableau 3.6) exposées à trois concentrations différentes d'aluminium, la concentration de 0 μ M d'Al servant de base d'origine pour les calculs.

Le gène 48E8 a été testé par PCR en temps réel mais aucune variation de nombres de cycle n'a été observée confirmant les résultats de la Figure 3.18.

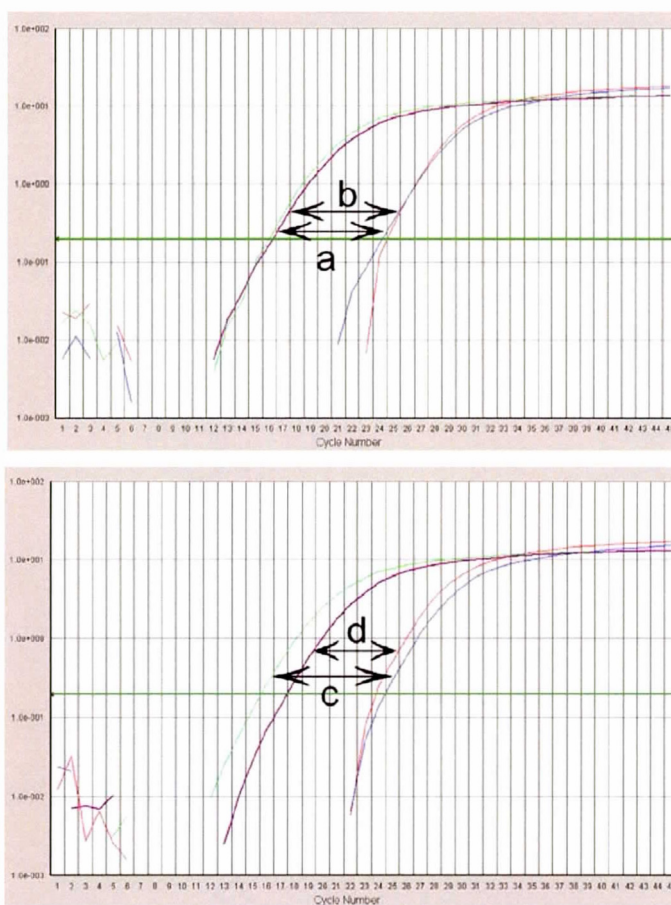


Figure 3.19 : Exemple de profils d'amplification obtenus par PCR en temps réel pour les gènes GA3PDH et 49A1 à 0 et 50 μ M d'aluminium pour les variétés Fundy et OK91G106.

— : amplifiats 49A1 0 μ M Al — : amplifiats 49A1 50 μ M Al
 — : amplifiats GA₃PDH 0 μ M Al — : amplifiats GA₃PDH 50 μ M Al

En ordonnée, le taux d'amplifiats sur une échelle logarithmique. En abscisse, le nombre de cycle correspondant à la détection des amplifiats encore appelé C_T . Les figures ne représentent qu'une partie des résultats sans les duplicata.

Pour chaque gène donné à une concentration d'aluminium donnée, une valeur moyenne des duplicata et de l'écart type qui en découle est calculée. Par exemple, pour le gène GA_3PDH à $0\mu M$ d'aluminium, l'ensemble des résultats sera exprimé sous la forme : $moyC_T GA_3PDH \pm dC_T GA_3PDH$ où $dC_T GA_3PDH$ est la variation standard et $moyC_T GA_3PDH$ la moyenne des C_T obtenus.

Les segments "a", "b", "c" et "d" correspondent à des différences de nombre de cycle entre l'apparition de signal pour une ligne de base de 0,2. Le segment "a" est par exemple la différence de cycle à $0\mu M$ d'Al entre les deux gènes GA_3PDH et 49A1 ($\Delta C_T 49A1-GA_3PDH 0\mu M$), et le segment "b" celle pour $50\mu M$ ($\Delta C_T 49A1-GA_3PDH 50\mu M$). Ainsi "a-b" ($\Delta \Delta C_T 50\mu M$ comparativement à $0\mu M$) signifiera s'il y a une dérégulation d'expression entre 0 et $50\mu M$ d'Al. Par exemple, pour Fundy (image du haut), l'aluminium ne semble pas déréguler l'expression des gènes puisque "a-b" ≈ 0 . Pour OK91G106 (image du bas), $c-d \geq 0$ ce qui signifie que 49A1 est surexprimé si GA_3PDH est pris comme référence ou à l'inverse, que GA_3PDH est réprimé si 49A1 est pris comme référence.

Tableau 3.5 : Quantité relative d'ARNm du gène 49A1 pour quatre variétés de blé et trois conditions d'exposition à l'aluminium

Source d'ARNm ⁽¹⁾	Moyenne C _T GA ₃ PDH ⁽²⁾	Moyenne C _T 49A1 ⁽²⁾	ΔC _T 49A1-GA ₃ PDH ⁽³⁾	-(ΔC _T 49A1 - ΔC _T 49A1)	-ΔΔC _T ⁽⁴⁾	Quantité d'ARNm 49A1 _{0μM Al} comparativement à 49A1 _{9μM Al} ⁽⁵⁾
Atlas-66 0μM	15,56±0,30	24,58±0,56	9,02±0,63	0,00±0,63 ⁽⁴⁾	0,00±0,63	1,00 (0,64-1,55)
Atlas-66 5μM	15,52±0,09	23,26±0,47	7,74±0,48	1,28±0,48	1,28±0,48	2,42 (1,73-3,38) ⁽⁵⁾
Atlas-66 50μM	16,25±0,04	23,90±0,16	7,65±0,16	1,37±0,16	1,37±0,16	2,58 (2,30-2,88)
OK91G106 0μM	15,52±0,02	23,75±0,03	8,24±0,04	0,00±0,04	0,00±0,04	1,00 (0,98-1,02)
OK91G106 5μM	15,09±0,18	22,38±0,13	7,29±0,22	0,95±0,22	0,95±0,22	1,93 (1,65-2,25)
OK91G106 50μM	17,46±0,13	24,06±0,45	6,60±0,47	1,64±0,47	1,64±0,47	3,11 (2,24-4,30)
Fundy 0μM	15,87±0,20	24,14±0,44	8,27±0,48	0,00±0,48	0,00±0,48	1,00 (0,72-1,40)
Fundy 5μM	16,54±0,06	23,85±0,27	7,32±0,28	0,95±0,28	0,95±0,28	1,94 (1,60-2,35)
Fundy 50μM	16,43±0,32	23,79±0,52	7,36±0,61	0,91±0,61	0,91±0,61	1,88 (1,23-2,86)
OK91G108 0μM	15,84±0,07	22,92±0,01	7,08±0,07	0,00±0,07	0,00±0,07	1,00 (0,95-1,05)
OK91G108 5μM	16,32±0,25	22,72±0,49	6,40±0,55	0,67±0,55	0,67±0,55	1,60 (1,09-2,33)
OK91G108 50μM	17,43±0,36	22,30±0,36	5,13±0,51	1,27±0,51	1,27±0,51	2,41 (1,69-3,43)

(1) : Origine des ARNm utilisés pour la PCR en temps réel. Nom de la variété et condition d'exposition à l'aluminium.
 (2) : Lecture par le programme du SDS 7700 d'ABI Prism des C_T. Les C_T correspondent aux intersections des courbes d'amplification exponentielle des ADN avec une ligne de base choisie. Leur unité arbitraire est le nombre de cycles. Les moyennes ont été calculées à partir des duplicata et les déviations standards ont été déterminées par les écarts-types.

(3) : ΔC_T est déterminée par la soustraction de la moyenne des C_T de GA₃PDH par la moyenne des C_T de 49A1. Par exemple, (24,58-15,56)=9,02. Les déviations standards sont calculées selon la formule suivante : $\sqrt{((dC_T)_{GA_3PDH})^2 + (dC_T)_{49A1}^2}$. Par exemple, $\sqrt{((0,30)^2 + (0,56)^2)}=0,63$.

(4) : -ΔΔC_T est calculée par la soustraction du ΔC_T à une concentration d'aluminium donnée avec celui à 0 μM d'aluminium. Par exemple, (9,02-9,02)=0,00. Les déviations standard sont les mêmes que pour ΔC_T à la concentration d'aluminium choisie.

(5) : Quantité relative d'ARNm du gène 49A1 pour une variété entre une concentration d'aluminium donnée (5 ou 50 μM d'Al) et la condition de non-exposition au métal (0μM d'Al). Cette quantité est estimée par l'expression $2^{-\Delta\Delta C_T}$. Par exemple, $2^{-(1,28-0,48)}=1,73$ et $2^{-(1,28-0,48)}=3,38$. (calculs réalisés d'après l'User Bulletin #2, december 11 1997, updated october 2001, Applied Biosystems).

Tableau 3.6 : Quantité relative d'ARNm du gène 49A1 pour six variétés de blé et trois conditions d'exposition à l'aluminium

Source d'ARNm ⁽¹⁾	Moyenne C _T GA ₃ PDH ⁽²⁾	Moyenne C _T 49A1 ⁽²⁾	ΔC _T 49A1-GA ₃ PDH ⁽³⁾	-(ΔC _{T, 49A1} - ΔC _{T, GA3PDH}) ⁽⁴⁾	-ΔΔC _T ⁽⁴⁾	Quantité d'ARNm 49A1 par rapport à 49A1 _{0μM Al} ⁽⁵⁾
Atlas-66 0μM	24,80±0,07	30,72±0,12	5,92±0,14	0,00±0,14 ⁽⁴⁾	0,00±0,14 ⁽⁴⁾	1,00 (0,91-1,10)
Atlas-66 5μM	27,61±0,04	31,55±0,40	3,94±0,40	1,98±0,40	1,98±0,40	3,93 (2,98-5,18) ⁽⁶⁾
Atlas-66 50μM	28,93±0,45	31,77±0,41	2,85±0,61	3,07±0,61	3,07±0,61	8,40 (5,52-12,78)
OK91G106 0μM	27,40±0,49	32,91±0,77	5,51±0,92	0,00±0,92	0,00±0,92	1,00 (0,53-1,89)
OK91G106 5μM	27,19±0,01	32,91±0,77	5,72±0,77	-0,21±0,77	-0,21±0,77	0,86 (0,50-1,47)
OK91G106 50μM	29,37±0,14	31,60±0,05	2,23±0,15	3,28±0,15	3,28±0,15	9,71 (8,76-10,78)
OK91G103 0μM	28,30±0,02	31,93±0,66	3,64±0,67	0,00±0,67	0,00±0,67	1,00 (0,63-1,59)
OK91G103 5μM	27,35±0,08	32,09±0,66	4,74±0,67	-1,11±0,67	-1,11±0,67	0,46 (0,29-0,74)
OK91G103 50μM	28,81±0,34	31,08±0,30	2,27±0,46	1,37±0,46	1,37±0,46	2,58 (1,88-3,54)
Fundy 0μM	27,14±0,03	32,20±0,07	5,06±0,08	0,00±0,08	0,00±0,08	1,00 (0,95-1,05)
Fundy 5μM	27,21±0,06	31,70±0,78	4,49±0,78	0,57±0,78	0,57±0,78	1,48 (0,86-2,55)
Fundy 50μM	28,64±0,03	30,75±0,00	2,11±0,03	2,95±0,03	2,95±0,03	7,73 (7,58-7,88)
OK91G108 0μM	27,33±0,04	31,91±0,25	4,59±0,26	0,00±0,26	0,00±0,26	1,00 (0,84-1,19)
OK91G108 5μM	27,47±0,04	30,80±0,78	3,34±0,78	1,25±0,78	1,25±0,78	2,38 (1,39-4,08)
OK91G108 50μM	29,73±0,34	31,60±0,14	1,87±0,37	1,47±0,37	1,47±0,37	2,76 (2,14-3,56)
OK91G107 0μM	27,06±0,10	32,90±0,56	5,84±0,57	0,00±0,57	0,00±0,57	1,00 (0,67-1,48)
OK91G107 5μM	26,53±0,16	32,38±0,32	5,85±0,35	0,01±0,35	0,01±0,35	0,99 (0,78-1,27)
OK91G107 50μM	28,53±0,18	30,48±0,00	1,96±0,18	3,89±0,18	3,89±0,18	14,83 (13,12-16,76)

(1) : Origine des ARNm utilisés pour la PCR en temps réel. Nom de la variété et condition d'exposition à l'aluminium.

(2) : Lecture par le programme du SDS 7700 d'ABI Prism des C_T. Les C_T correspondent aux intersections des courbes d'amplification exponentielle des ADN avec une ligne de base choisie. Leur unité arbitraire est le nombre de cycles. Les moyennes ont été calculées à partir des duplicata et les déviations standards ont été déterminées par les écarts-types.

(3) : ΔC_T est déterminée par la soustraction de la moyenne des C_T de GA₃PDH par la moyenne des C_T de 49A1. Par exemple, (30,72-24,80)=5,92. Les déviations standards sont calculées selon la formule suivante : $\sqrt{((dC_{T, GA3PDH})^2 + (dC_{T, 49A1})^2)}$. Par exemple, $\sqrt{((0,07)^2 + (0,12)^2)}=0,14$.

(4) : -ΔΔC_T est calculée par la soustraction du ΔC_T à une concentration d'aluminium donnée avec celui à 0 μM d'aluminium. Par exemple, (5,92-5,92)=0,00. Les déviations standard sont les mêmes que pour ΔC_T à la concentration d'aluminium choisie.

(5) : Quantité relative d'ARNm du gène 49A1 pour une variété entre une concentration d'aluminium donnée (5 ou 50 μM d'Al) et la condition de non-exposition au métal (0μM d'Al). Cette quantité est estimée par l'expression $2^{-\Delta\Delta C_T}$. Par exemple, $2^{1,98}=3,93$. Les déviations sont calculées en ajoutant ou soustrayant les valeurs des variations standard des ΔΔC_T. Par exemple, $2^{(1,98+0,40)}=2,98$ et $2^{(1,98-0,40)}=5,18$.

(calculs réalisés d'après l'User Bulletin #2, december 11 1997, updated october 2001, Applied Biosystems).

Deux séries d'expériences de PCR en temps réel pour le gène 49A1 ont été effectuées à partir des deux lots d'ARN. La première a utilisé les ARN des plantes décrites dans la **Figure 3.5**. Les mesures ont été effectuées en duplicata et sont décrites dans le **Tableau 3.5**. La **Figure 3.20** donne une représentation graphique des quantités relatives d'ARNm du gène 49A1 observées. Dans les conditions de croissance dépourvues d'aluminium, le niveau d'expression du gène 49A1 est 130 fois inférieur à celui du gène GA₃PDH qui est généralement considéré comme un gène modérément exprimé justifiant le statut de gène très faiblement exprimé de 49A1. La **Figure 3.20** montre que, pour toutes les conditions confondues, les quantités d'ARNm sont supérieures à 0 signifiant que le gène 49A1 est induit par l'aluminium de façon générale aussi bien chez les blés tolérants que les blés sensibles.

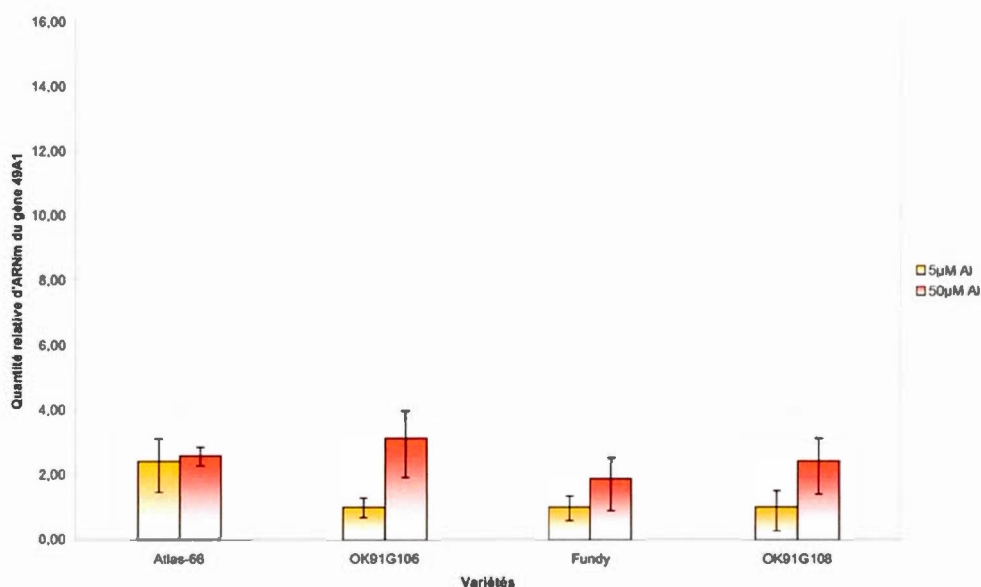


Figure 3.20 : Représentation graphique des quantités d'ARNm du gène 49A1 relativement à ceux du gène GA₃PDH pour quatre variétés de blé exposées à différentes concentrations d'aluminium.

Cependant, ces inductions sont plus élevées pour les blés tolérants Atlas-66 et OK91G106 notamment à 50 μM . De plus, les quantités relatives d'ARNm montrent une augmentation du taux d'expression du gène 49A1 à 50 μM d'aluminium chez les blés tolérants supérieure à celle observée chez les blés sensibles exposés à 5 μM d'aluminium suggérant une induction du gène 49A1 plus élevée chez les blés tolérants pour des niveaux de stress similaires. Cette expérience de PCR en temps réel confirme les profils RT-PCR observés sur la **Figure 3.18** : l'augmentation est de l'ordre d'un facteur 2 en RT-PCR et en PCR en temps réel de l'ordre de 1,93 à 3,11. Il est à noter que ce sont les mêmes ARN qui ont été utilisés pour les deux types d'expériences RT-PCR et PCR en temps réel confirmant que ces deux techniques donnent des résultats allant dans le même sens.

La représentation de résultats de PCR en temps réel rapportée comme correcte par les experts est celle de la forme du **Tableau 3.5** où sont indiquées les valeurs relatives de quantité d'ARN directement en relation avec les $-\Delta\Delta C_T$ et leurs valeurs d'erreur (indiquées entre parenthèses dans le tableau selon le bulletin d'utilisateur du fournisseur Applied Biosystem). Les valeurs générées par les courbes de C_T devant être mises à la puissance carrée, il en résulte que les valeurs d'erreur sont sur-estimées pour intégrer un écart de confiance. Ainsi, les représentations graphiques de la **Figure 3.20** et de la **Figure 3.21** n'ont été générées que pour visualiser plus facilement les variations relatives des quantités d'ARN décrites dans les tableaux $-\Delta\Delta C_T$. Des auteurs ont essayé d'appliquer des études statistiques aux résultats de PCR en temps réel (**Yuan et al., 2006**). Confirmant que la meilleure représentation des résultats de PCR en temps réel est celle des $-\Delta\Delta C_T$ avec la mention de l'écart de confiance, ils ont aussi démontré que plusieurs tests de probabilité pouvaient être appliqués aux valeurs de $-\Delta\Delta C_T$, notamment le test de Student. Le test de **Yuan et al. (2006)** a été appliqué aux résultats de PCR en temps réel. Les $-\Delta\Delta C_T$ à 5 μM d'aluminium sont différents de ceux à 0 μM avec une probabilité de $p=0,0045$. De la même façon, ceux de 50 μM sont différents de ceux de 0 μM avec une probabilité de $p=0,0033$.

Avec la deuxième série d'ARN issus des six plantes de la **Figure 3.6** (trois tolérantes et trois sensibles), une dérégulation du gène 49A1 est aussi bien observée pour les plantes sensibles que pour les plantes tolérantes (**Tableau 3.6** et **Figure 3.21**). Les mesures des données ont été effectuées en duplicata et l'expérience a été répétée deux fois pour confirmer les résultats. Les deux expériences de PCR en temps réel sur ces nouveaux ARN donnaient des valeurs numériques similaires. Le résultat pour le blé OK91G107 exposé à 50 μM d'Al doit être écarté car un aplatissement anormal des courbes a été observé. Cet aplatissement a été observé sur les quatre mesures effectuées. Les ARN non traités (contrôle de contamination ADN) de cet échantillon ne montraient aucune amplification PCR. Tout porterait à penser qu'une contamination de cet échantillon a eu lieu lors de l'étape de reverse transcription ou qu'une erreur de pipetage a conduit à l'ajout trop important d'ADNc lors des réactions de PCR. Cette contamination hypothétique a conduit à l'obtention d'une ΔC_T très faible ($1,96 \pm 0,00$) entre GA_3PDH et 49A1 pour la condition de 50 μM d'Al. Lorsque cet échantillon a été de nouveau analysé avec un gène contrôle (voir paragraphes suivants), un ΔC_T beaucoup plus faible et proche de celui de Fundy a été obtenu avec ces mêmes échantillons ARN confirmant bien une erreur technique et non une réelle variation d'expression génétique. Les données de $-\Delta\Delta C_T$ sont statistiquement différentes de zéro avec une probabilité de 0,0236 pour les valeurs à 5 μM et de 0,0248 pour les valeurs de 50 μM (selon **Yuan et al., 2006**).

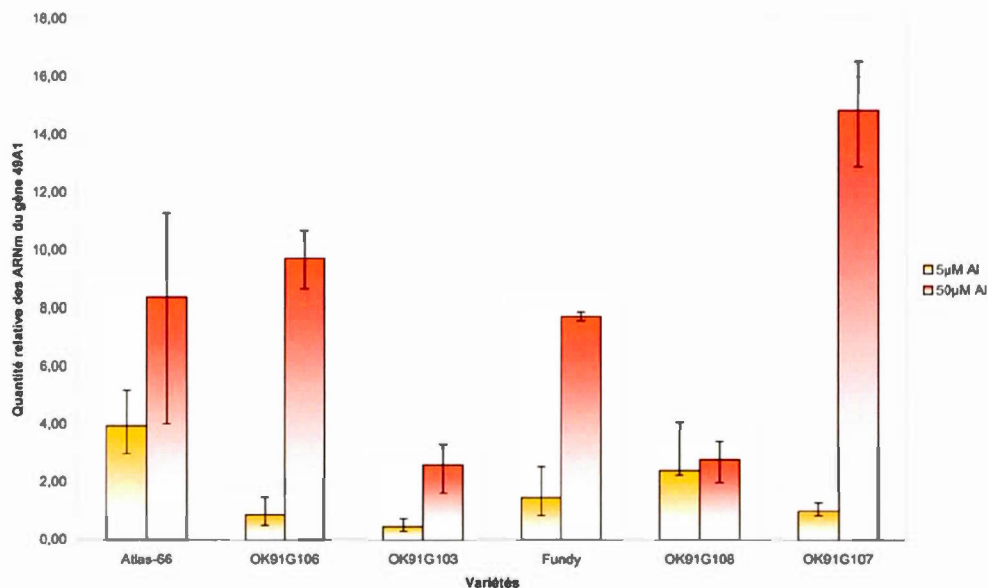


Figure 3.21 : Représentation graphique des quantités d'ARNm du gène 49A1 relativement à ceux du gène GA₃PDH pour six variétés de blé exposées à différentes concentrations d'aluminium.

L'aluminium induit l'expression du gène 49A1 dans toutes les conditions expérimentales exceptées pour les blés OK91G106 et OK91G103 exposés à 5 μM d'aluminium. Les blés OK91G106 montrent une variation $-\Delta\Delta C_T$ quasiment nulle signifiant que le gène 49A1 n'est pas induit chez cette variété pour cette concentration d'aluminium. De la même manière, 49A1 semble réprimé à 5 μM d'Al ($-\Delta\Delta C_T = -1,11 \pm 0,006$) chez les blés OK91G103. Ces données sont inversement proportionnelles à celle du facteur d'inhibition de croissance racinaire (RGI) observé sur le **Figure 3.6**. Ainsi, il semble y avoir une corrélation entre le taux d'inhibition de croissance des racines et le taux d'expression du gène 49A1 : le gène 49A1 ne serait induit que lorsque les racines ont du mal à pousser. Pour des états physiologiques identiques (50 μM d'aluminium pour les plantes tolérantes et 5 μM d'aluminium pour les plantes sensibles), les plantes tolérantes semblent exprimer le gène 49A1 plus

fortement que les plantes sensibles : des quantités relative d'ARNm de l'ordre 8,40 / 9,71 / 2,58 sont respectivement observées pour Atlas-66, OK91G106 et OK91G103 (50 μ M) contre 1,48 / 2,38 / 0,99 respectivement pour Fundy, OK91G108 et OK91G107 (5 μ M).

En résumé, lorsque la **Figure 3.21** est comparée à la **Figure 3.20**, une tendance peut être mise en avant : le gène 49A1 semble être plus exprimé chez les plantes tolérantes que chez les plantes sensibles pour des états de stress similaires. De par la variabilité des échantillons d'une expérience à l'autre, il est difficile de connaître très précisément l'état physiologique de la plante (l'indice RGI n'étant certainement pas suffisamment précis) et seule une répétition de PCR en temps réel sur de nombreuses séries d'ARN pourrait permettre de connaître avec exactitude le taux de variation du gène 49A1 parmi toutes ces variétés.

Une nouvelle expérience de PCR en temps réel a été réalisée sur la même deuxième série d'ARN issus des six plantes de la **Figure 3.6** (trois tolérantes et trois sensibles) en y rajoutant le gène contrôle *War 7.2*, un gène retrouvé surexprimé par l'aluminium par *northern blot* (Hamel *et al.*, 1998 ; **Figure 3.3** et **Figure 3.22**). Le gène *War 7.2* est un gène de stress induit par l'aluminium chez le blé tolérant Atlas-66 et le blé sensible Fredrick.

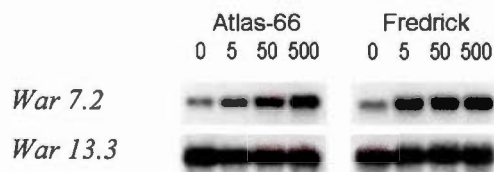


Figure 3.22 : Effets de l'aluminium sur l'accumulation des ARNm du gène *War 7.2* chez la variété Atlas-66 et Fredrick de blé.

Extrait partiel de la Figure 3.3. *Northern blot* réalisés avec 5 μ g d'ARN totaux extraits des pointes de racines des blés d'Atlas-66 et Fredrick exposés pendant 24 heures à 0, 5, 50 et 500 μ M d'Al. Chaque membrane a été hybridée avec une sonde spécifique contrôle radioactive (gène *War 13.3* codant pour la tubuline) et le gène *War 7.2* codant pour une phénylalanine ammonia-lyase (d'après Hamel *et al.*, 1998).

La **Figure 3.23** représente un histogramme des quantités relatives d'ARNm du gène 49A1 à partir du **Tableau 3.7**. Des résultats similaires à la **Figure 3.21** ont été obtenus même si les ΔC_T sont plus élevées pour les variétés tolérantes Atlas-66 et OK91G106 à 50 μM d'aluminium (aucun duplicata n'a été effectué pour les C_T de 49A1). De plus, ces nouveaux résultats confirment l'erreur technique pour l'échantillon OK91G107 à 50 μM d'aluminium puisque, cette fois, une quantité beaucoup plus faible d'ARNm 49A1 a été détecté. Par PCR en temps réel, le gène *War 7.2* est bien surexprimé chez la variété tolérante Atlas-66 à 5 et 50 μM d'aluminium, rejoignant les résultats d'**Hamel et al. (1998)** et validant ainsi le procédé de PCR en temps réel par lui-même en utilisant le gène GA_3PDH comme contrôle. *War 7.2* est aussi induit chez les autres variétés tolérantes OK91G106 et OK91G103 mais une diminution d'expression est observée pour OK91G103 exposé à 5 μM de métal (quantité relative d'ARNm d'un facteur 0,35). Chez les variétés sensibles, *War 7.2* est très faiblement induit. Ce résultat semble en contradiction avec ceux d'**Hamel et al.** où *War 7.2* était fortement induit chez la variété sensible Fredrick. Ceci peut s'expliquer par une différence d'expression génétique entre Fredrick et les autres variétés sensibles étudiées dans cette thèse.

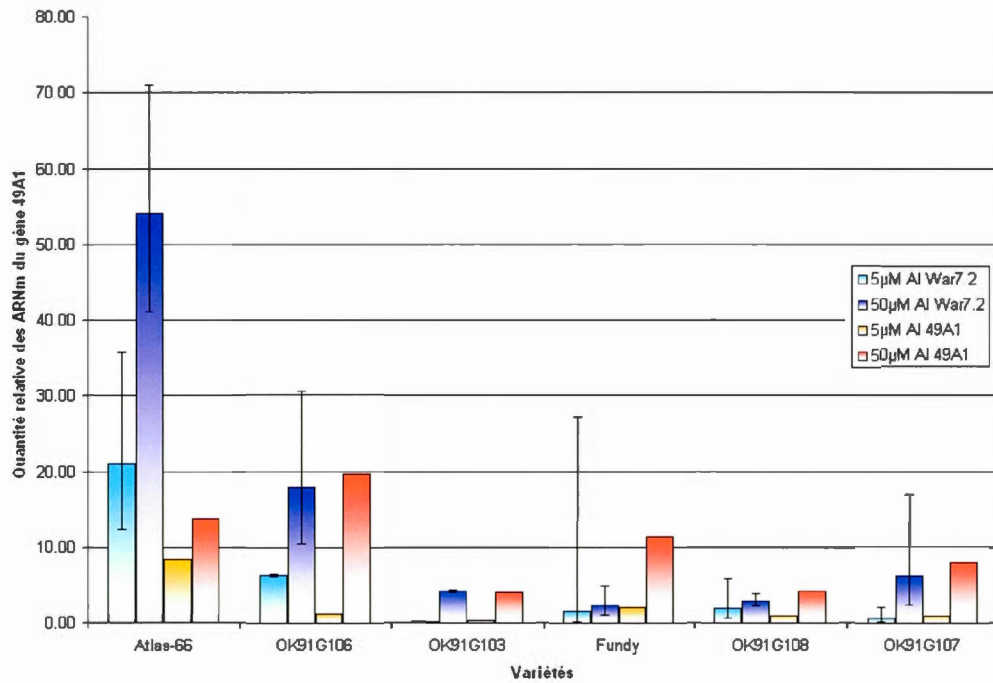


Figure 3.23 : Représentation graphique des quantités d'ARNm du gène 49A1 relativement à ceux du gène GA_3 PDH et du gène *War 7.2* pour six variétés de blé exposées à différentes concentrations d'aluminium.

Tableau 3.7 : Quantité relative d'ARNm des gènes 49A1 et War 7.2 pour six variétés de blé et trois conditions d'exposition à l'aluminium.

Source d'ARNm ⁽¹⁾	Quantité d'ARNm 49A1 _{0µM Al} comparativement à 49A1 _{0µM Al} ⁽²⁾	Quantité d'ARNm War 7.2 _{0µM Al} comparativement à War 7.2 _{0µM Al} ⁽³⁾
Atlas-66 0µM	1,00	1,00 (0,17-5,62)
Atlas-66 5µM	8,40	20,97 (12,29-35,78)
Atlas-66 50µM	13,83	54,00 (41,09-70,98)
OK91G106 0µM	1,00	1,00 (0,93-1,07)
OK91G106 5µM	1,22	6,30 (6,18-6,42)
OK91G106 50µM	19,56	17,88 (10,49-30,45)
OK91G103 0µM	1,00	1,00 (0,46-2,14)
OK91G103 5µM	0,35	0,13 (0,11-0,15)
OK91G103 50µM	3,97	4,13 (3,95-4,31)
Fundy 0µM	1,00	1,00 (0,93-1,08)
Fundy 5µM	2,01	1,62 (0,10-27,19)
Fundy 50µM	11,31	2,35 (1,12-4,93)
OK91G108 0µM	1,00	1,00 (0,41-2,45)
OK91G108 5µM	0,90	1,96 (0,67-5,75)
OK91G108 50µM	4,13	2,84 (2,14-3,75)
OK91G107 0µM	1,00	1,00 (0,54-1,86)
OK91G107 5µM	0,95	0,61 (0,19-1,98)
OK91G107 50µM	7,97	6,23 (2,30-16,9)

(1) : Origine des ARNm utilisés pour la PCR en temps réel. Nom de la variété et condition d'exposition à l'aluminium.

(2) : Quantité relative d'ARNm du gène 49A1 pour une variété entre une concentration d'aluminium donnée (5 ou 50 µM d'Al) et la condition de non-exposition au métal (0µM d'Al). Cette quantité est estimée par l'expression $2^{-\Delta\Delta CT}$. Aucun écart de confiance n'a été calculé pour 49A1 car les mesures n'ont pas été effectuées en duplicata.

(3) : Quantité relative d'ARNm du gène 49A1 pour une variété entre une concentration d'aluminium donnée (5 ou 50 µM d'Al) et la condition de non-exposition au métal (0µM d'Al). Cette quantité est estimée par l'expression $2^{-\Delta\Delta CT}$. L'écart de confiance résultant des mesures en duplicata de GA₃PDH et War 7.2 est précisé entre parenthèse.

(calculs réalisés d'après l'User Bulletin #2, décembre 11 1997, updated october 2001, Applied Biosystems).

3.3.2. RECHERCHE DE LA SÉQUENCE ENTIÈRE DU GÈNE ET DE LA PROTÉINE 49A1 DE BLÉ

De nombreuses tentatives expérimentales ont tenté d'isoler la séquence complète du gène 49A1. Les tentatives PCR et PCR nichée sur les produits GeneRacer, alors qu'elles ont été fructueuses pour le gène 48E8 (**Figure 3.11**), n'ont pas permis de connaître la séquence entière de ce gène. Le gène 49A1 étant détecté sur les produits GeneRacer et dans les banques Gateway, des expériences de synthèse de plasmide similaires à celles de mutagenèse dirigée (QuickCharge, STRATAGENE) ont été tentées sans succès. De nouvelles expériences PCR avec des amorces se fixant sur le plasmide (amorces commerciales SP6 et T7) et sur la séquence du gène ont aussi été réalisées mais n'ont pas abouti. Enfin des criblages de banque d'ADNc ont été effectués mais n'ont pas donné les résultats escomptés.

Toutefois, des études d'homologies de séquences ont été réalisées. Le gène 49A1 présente une homologie importante (89%) mais avec un faible facteur e (5^{e-27}) avec le gène de riz annoté AE017085 codant pour un transporteur d'oligo-peptide proton dépendant. Cette faiblesse du facteur e peut être liée à une délétion de 18 nucléotides dans la séquence de 49A1 par rapport à celle de AE017085 (**Figure 3.24**). Lorsque cette séquence est enlevée et les calculs d'homologie répétés, ce facteur e est de 4^{e-66} ce qui représente finalement une très forte homologie.

```

49A1 -----10      20
                CATCGGCATGCTCGAGTTC
AE017085 CCGTCCTTCTTCGTGCTGGGCGCCGGGGAGGTGTTTCGCCGTCATCGGCATGCTGGAGTTC
                1330      1340      1350      1360      1370      1380

49A1 30      40      50      60      70      80
                TTCTACGACCAGCCCCGGAGTCCATGAAGAGCCTGGGTGTGGCACTCGCGCAGCTCGCC
AE017085 TGCTACGAGCAGTCGCCGGCGTCGATGAAGAGCCTCGGCACGGCGCTCGTGCAGCTCGCC
                1390      1400      1410      1420      1430      1440

49A1 90      100     110     120     130     140
                GTTGTGGCGGGAACCTCAACTCCGCCCTGCTCGGCGCCGTTGTGTGGCCACGG--
AE017085 GTCGCCGTCGCCAACTACCTCAACTCCGGCATGCTCAGGGTGGTGGCGGCGGCCACGGCG
                1450      1460      1470      1480      1490      1500

49A1 -----150     160     170     180     190
                GGTGGATCCCGGACAACCTCGACGAAGGCCATCTGAACTACTTC
AE017085 CGCGGCGGCGGCGCGCGGGTGGATCCCGGACAAGCTCGACGAGGGCCATCTGGACTACTTC
                1510     1520     1530     1540     1550     1560

49A1 200     210     220     230     240     250
                TTCTGGTTCATGGCGGCTCTGAGCGTGCTCAACCTGCTGCAGTTCGTCTACTGCTCGTCC
AE017085 TTCTGGATGATGGCTGCACTCAGCGTGCTCAACCTGCTGCAGTTCCTGCACTGCTCAATC
                1570     1580     1590     1600     1610     1620

49A1 260     270     280     290     300
                AGATACAAAAGATAATGATCGATATTTTCGTAACCTATAGATGTATAGTTTGT
AE017085 AGATTCAGAGGCAA-----CAACACACT-GTCATCATCG-----TGA
                1630     1640     1650

```

Figure 3.24 : Alignement de la séquence de 49A1 avec la séquence annotée de AE017085.

CGCGC : région manquante de 18 nucléotides (3x6) chez 49A1

▼ : insertion de base chez l'EST de blé (cf. Figure 3.26)

Cette délétion de 18 nucléotides peut s'expliquer par (i) une mauvaise annotation de cette région chez AE017085, (ii) une réelle délétion présente chez le blé mais pas chez le riz ou encore (iii) une mauvaise rétro-transcription de cette région composée uniquement de G et de C.

CCACGCGTCCGGGAACTTCCTAAGAATACTTCACAAATAGTCTTGAGAATACTGCATCGA
 GTGTCAAATGGAAGCAGCAGATGAGGAGAGGCCACTGCTGAACCGCCATCGCCGGCCTG
 CACAGACACAGGACGAAAGCTCAAGTTATAACAAGTGATGGAACGGTTGATATCTACAGA
 CAGCCTGCTCTCAAGCAGAGCACTGGCAACTGGAGAGCATGCTTCTTCATTCTAGGCGCC
 GAATTCAGCGAATGCATGTGCTTCTTCGCCGTCGCCAAGAAGTTGGTCACCTACCTTACGA
 CGGTGCTCCATGAGAGCAACGTCGACGCTGCGAGGAACGTGTGCACTTGATCGGCAGCT
 GCTTCTCACGCCGGTCATCGGAGCCTTCTTGCCGACTCTTACTGGGGAAGATCACCACA
 ATTGCAGTTTTCTGTGCGTTTACATCGTTGGGATGCTCATCGTGACATCATCGGCCGGC
 TTCCGTTTCTCCTCCTCGTTCCTCCGACGAGAGTGGTGGTGTCCATCCTGCCGCCGTATAC
 CTGGGGCTCTACCTTGTGCGCCTCGGCACA*GGTGAATCAAGCCCTGTGCCGCGGCCTT
 GGGCGCCGATCAGTTCGACGGCGCCGACCCAATGGAGCGGGTGGNCNANGGCTCCTTTCT
 CAATCGTACTACTTCTCGATCAACATTGGCTCGCTGCTGGCGGCGACATCTGCTGGG
 TGCAGGACAACAT~~~~~GTTCCGAGCATCGGCATGCTCGAGTTCTTCTACGACCAG
 TCCCCGGGGTCCATGAAGAGCCTCGGCACGGAACGCTCGCGCTGCTCGCCATCGCTG
 GCGGTAACCTCAACTCTGTCTACTCGGCGCTGTGCGCTCGACCACCGGGTGG
 ATCGCGGACAATCTCGACCAAGGCCACCTTGACTACTTCTTCTGGTTCATGGCCGCT
 CTCAGCGTGTCAACCTGTTGCAGTTTCGTCTACTGCTCGACCAGATACAAAAGCATA
 GATCAGCATTAGTATAGCAGTCAATTGTAATGTTCTTAATTTGAAAATCTTTCATCGATC
 GTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Figure 3.25 : Séquence partielle de l'EST de Norstar.

GTTCG : séquence homologue à 49A1

~~~~~ : césure de séquence

**A** : erreur hypothétique de séquençage

**\*** : position des 18 bases supplémentaire chez le gène AE017085 de riz.

Grâce à une collaboration dans le cadre d'un projet Génomique au sein du laboratoire du Professeur Fathey Sarhan (UQAM), un EST homologue à 49A1 a pu être identifié dans une banque d'ADNc de racine du blé d'hiver Norstar (88% d'homologie avec un facteur  $e$  de  $10^{-70}$ ). L'analyse comparative des séquences de 49A1 avec celle de l'EST a montré que la séquence supplémentaire du gène annoté du riz n'était pas présente dans la séquence de l'EST (\*) suggérant une mauvaise annotation du gène AE017085 ou une différence entre le blé et le riz. La séquence de l'EST de blé Norstar disponible n'est pour l'instant que partielle (Figure 3.25) et comporte certaines erreurs de séquençage semble-t-il : trois bases ont été ajoutées (marquées en rouge) alors qu'elles ne sont pas présentes dans la séquence de 49A1 et du gène annoté de riz AE017085 (▼ Figure 3.24). Une fois ces erreurs corrigées (les bases ont été supprimées de la séquence de l'EST), les séquences traduites des protéines ont été comparées et ont montré plus de 85% d'identité en acides aminés

(Figure 3.27). Les protéines de ces gènes possèdent un domaine PTR2, spécifique des protéines POT, transporteurs d'oligo-peptide proton dépendants.

```

49A1      10      20      30      40      50      60
49A1      GTTCACCAGCATCGGCATGCTCGAGTTCTTCTACGACCAGCCCCGGAGTCCATGAAGAG
EST       GTTCGCCAGCATCGGCATGCTCGAGTTCTTCTACGACCAGTCCCCGGGTCCATGAAGAG
          10      20      30      40      50      60

49A1      70      80      90      100     110
49A1      CCTGGGTGTGG-CACTCGCGCAGCTCGCCGTTGCTGGCGGGAACCTCAACTCCGCCC
EST       CCTCGGCACGGAAGCTCGCGCTGCTCGCCATCGCTGGCGGTAACCTCAACTCTGTCC
          70      80      90      100     110     120

49A1     120     130     140     150     160     170
49A1     TGCTCGGCGCCGTTGTGTGTCGGCCACGG*GGTGGATCCCGGACAACCTCGACGAAGGCCATC
EST      TACTCGGCGCTGTGCGCTCGACCACCG*GGTGGATCGCGGACAATCTCGACCAAGGCCACC
          130     140     150     160     170     180

49A1     180     190     200     210     220     230
49A1     TGAACTACTTCTTCTGGTTCATGGCGGCTCTGAGCGTGCTCAACCTGCTGCAGTTCGTCT
EST      TTGACTACTTCTTCTGGTTCATGGCGGCTCTCAGCGTGCTCAACCTGTTGCAGTTCGTCT
          190     200     210     220     230     240

49A1     240     250     260     270     280     290
49A1     ACTGCTCGTCCAGATACAAAAG-ATA-ATGATCGATATTTTCG----TAACTATAGATGT
EST      ACTGCTCGACCAGATACAAAAGCATAGATCAGCATTAGTATAGCAGTCAATTGTAAATGT
          250     260     270     280     290     300

49A1      300
49A1      --ATAGTTTG
EST       TCTTAATTTG
          310

```

**Figure 3.26 : Alignement de la séquence de 49A1 avec un EST du blé Norstar.**

\* : position de l'insertion de séquence du gène annoté de riz AE017085

A : insertion d'une base

TAA et TGA : codons stop

```

          10      20      30      40      50      60
49A1 : FTSIGMLEFFYDQPPEMKS LGVALAQLAVAGGN YLNSALLGAVVSATGWI PDNLDEGHL
      : ..... : ..... : ..... : ..... : ..... : .....
ESTc : FASIGMLEFFYDQSPGSMKSLGTALALLAIAGGN YLNSVLLGAVASTTGWIADNLDQGHL
          10      20      30      40      50      60

          70      80
49A1 : NYFFWFMAALSVLNLLQFVYC SRYKR*
      : ..... : ..... : ..... : ..... : ..... : .....
ESTc : DYFFWFMAALSVLNLLQFVYC STRYKR*
          70      80

```

**Figure 3.27 : Alignement entre la séquence protéique traduite de 49A1 et la séquence protéique traduite après correction de l'EST du blé Norstar.**

\* : fin de traduction (codon stop)

ESTc : correction effectuée sur la séquence de l'EST du blé Norstar à partir de la Figure 3.26.

Tout récemment, un EST présentant une très grande homologie (facteur  $e$  de  $6e^{-166}$ ) avec le gène 49A1 a été isolé par un consortium de séquençage systématique de banque d'ADNc et de génome de plantes (Genoplante). Cet EST est complémentaire tout le long de la séquence du fragment 49A1 excepté pour une mutation ponctuelle en position 143 (**Figure 3.28**). La variété de blé *Triticum aestivum* utilisée n'a pas été précisée mais ce résultat confirme les insertions de bases accidentelles dues au séquençage chez l'EST de Norstar.



```

49A1 1   GTTCACCAGCATCGGCATGCTCGAGTTCTTCTACGACCAGCCCCGGAGTCCATGAAGAG 60
CD894318 360 GTTCACCAGCATCGGCATGCTCGAGTTCTTCTACGACCAGCCCCGGAGTCCATGAAGAG 301

49A1 61   CCTGGGTGTGGCACTCGCGCAGCTCGCCGTTGCTGGCGGAACTACCTCAACTCCGCCCT 120
CD894318 300 CCTGGGTGTGGCACTCGCGCAGCTCGCCGTTGCTGGCGGAACTACCTCAACTCCGCCCT 241

49A1 121  GCTCGGCGCCGTTGTGTGCGCCACGGGTGGATCCCGGACAACCTCGACGAAGGCCATCT 180
CD894318 240 GCTCGGCGCCGTTGTGTGCGCCACGGGTGGATCCCGGACAACCTCGACGAAGGCCATCT 181

49A1 181  GAACTACTTCTTCTGGTTCATGGCGGCTCTGAGCGTGCTCAACCTGCTGCAGTTCGTCTA 240
CD894318 180 GAACTACTTCTTCTGGTTCATGGCGGCTCTGAGCGTGCTCAACCTGCTGCAGTTCGTCTA 121

49A1 241  CTGCTCGTCCAGATACAAAAGATAATGATCGATATTTTCGTAACATAGATGTATAGTTT 300
CD894318 120 CTGCTCGTCCAGATACAAAAGATAATGATCGATATTTTCGTAACATAGATGTATAGTTT 61

49A1 301  GT 302
CD894318 60  GT 59

```

**Figure 3.28 : Alignement de séquence entre le fragment 49A1 et l'EST de blé CD89431.**

```

GGTGGGGTTAGCCGTTTGTAGACCTGATGATGGGCTTCGTTTCCTTTCGTATGCGATG
CGTCTTTCTGGATGAACCCTGTAAATTCTGGGAGGTCGCCCCGTGTGCTGCCTATGGTA
ATCGCGACTAGTTTCGACCCTAAAACAAAAAAAAAAAAAAAAAAGGGCGCGCCGCCATGGC
GTACGCCGCGTCCGGTCGAACTAGACGGCTGTGCGCGACCTCGATGAGCATCATGTGG
CTAGCGCCGTGCTACTTCGTGCTGGGCGCGGCCGAGGTGTTCCACCAGCATCGGCATGC
TCGAGTTCTTCTACGACCAGCCCCGGAGTCCATGAAGAGCCTGGGTGTGGCACTCGC
GCAGCTCGCCGTTGCTGGCGGAACTACCTCAACTCCGCCCTGCTCGGCGCCGTTGTG
TCGGCCCCGGGTGGATCCCGGACAACCTCGACGAAGGCCATCTGAACTACTTCTTCT
GGTTCATGCGGGCTCTGAGCGTGCTCAACCTGCTGCAGTTCGTCTACTGCTCGTCCAGA
TACAAAAGATAATGATCGATATTTTCGTAACATAGATGTATAGTTTGTACGCAAATGGTG
AGGAAAAGAAGCTTTATAGCGACAAAAAAGTAAATTGCCTTGT

```

**Figure 3.29 : Séquence entière de l'EST CD89431**

Souligné : séquence Kozak ; En bleu : séquence homologue à 49A1 ; En vert : hypothétique codon d'initiation de la traduction ; En rouge : hypothétique codon stop.

VGLAVC\***T**\***W**ASFPFVCDASFW**M**NPVNSGRSPRVLP**M**VIATSFDPKTKKKK  
 KRAA**A****M**YAASVETRRLSATS**M**S**M**WLAPCYFVLGAAEVFTSIG**M**LEFFYD  
 QPPE**S****M**KSLGVALAQLAVAGGNLNSALLGAVVSAPGWIPDNLDEGHLNYF  
 FWF**M**AALSVLNLLQFVYCSSRYKR\*\*SIFS\***L**\***M**YSLYANGEEKKLYSDKKKV  
 NCL

**Figure 3.30 : Séquence d'acides aminés traduite à partir de l'EST CD89431 de blé.**

\* : codon stop ; Souligné : position de la séquence Kozak

La séquence de la protéine 49A1 se composerait de 121 acides aminés à partir de la méthionine de la séquence Kozak.

A la différence de l'EST du blé Nortsar, l'EST CD894318 semble coder pour une protéine entière vu qu'une séquence d'initiation à la traduction Kozak est présente (**Figure 3.29**). Cet EST coderait pour une protéine de 121 acides aminés (si la traduction s'effectue à partir de la première méthionine de la séquence Kozak ; **Figure 3.30**) possédant un domaine PTR2 (transporteur d'oligopeptide proton dépendant).

### 3.3.3. PRÉDICTIONS DES RÉGIONS TRANSMEMBRANAIRES ET DU RÔLE POTENTIEL DU PROMOTEUR DU GÈNE 49A1

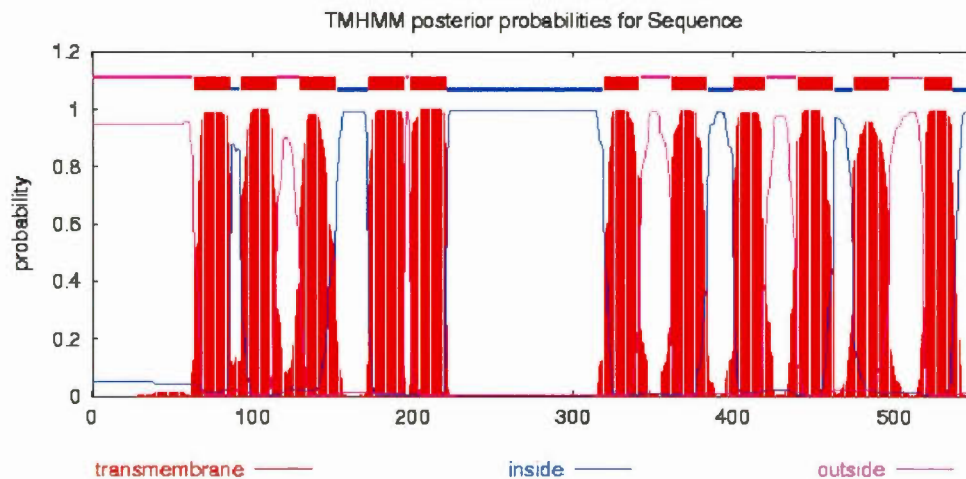
Différents algorithmes informatiques disponibles sur Internet ont été appliqués à la séquence de la protéine traduite ou à la séquence nucléotidique des homologues du gène 49A1 afin de prédire les régions transmembranaires de la protéine et de comprendre comment le gène pourrait être régulé au niveau de sa séquence promotrice. L'analyse par les outils informatiques TMHMM, HMMTOP, et SOSUI (tous les liens sont disponibles sur le site [www.infobiogen.fr](http://www.infobiogen.fr)) confirment l'existence chez la protéine annotée AAP53384 de riz de 10 à 11 segments trans-membranaires (**Tableau 3.8**, **Figure 3.31** et **Figure 3.32**). Ainsi, le gène AE017085 de riz coderait

pour un transporteur d'oligo-peptide proton dépendant situé au niveau d'un système membranaire. Au contraire de la protéine de riz, la protéine de blé CD89431 serait beaucoup plus courte et ne présenterait que 3 hélices transmembranaires (**Figure 3.33**). Le domaine PTR2 couvrirait l'ensemble des hélices. Il semble y avoir un lien fort entre la structure secondaire de la protéine et son domaine fonctionnel.

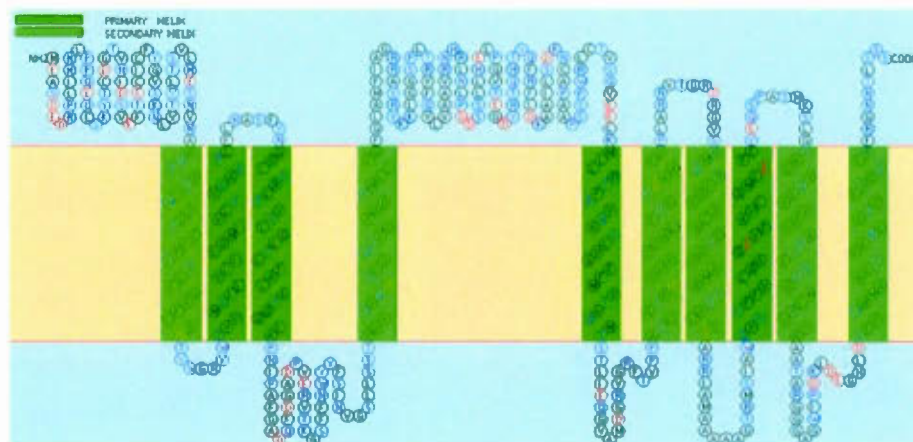
**Tableau 3.8 : Analyse par le programme TMHMM des positionnements des acides aminés de la protéine AAP53384.**

| Position de la chaîne peptidique | Premier acide aminé | Dernier acide aminé |
|----------------------------------|---------------------|---------------------|
| outside                          | 1                   | 63                  |
| Tmhelix                          | 64                  | 86                  |
| inside                           | 87                  | 92                  |
| Tmhelix                          | 93                  | 115                 |
| outside                          | 116                 | 129                 |
| Tmhelix                          | 130                 | 152                 |
| inside                           | 153                 | 172                 |
| Tmhelix                          | 173                 | 195                 |
| outside                          | 196                 | 198                 |
| Tmhelix                          | 199                 | 221                 |
| inside                           | 222                 | 319                 |
| Tmhelix                          | 320                 | 342                 |
| outside                          | 343                 | 361                 |
| Tmhelix                          | 362                 | 384                 |
| inside                           | 385                 | 400                 |
| Tmhelix                          | 401                 | 420                 |
| outside                          | 421                 | 439                 |
| Tmhelix                          | 440                 | 462                 |
| inside                           | 463                 | 474                 |
| Tmhelix                          | 475                 | 497                 |
| outside                          | 498                 | 518                 |
| Tmhelix                          | 519                 | 536                 |
| inside                           | 537                 | 551                 |



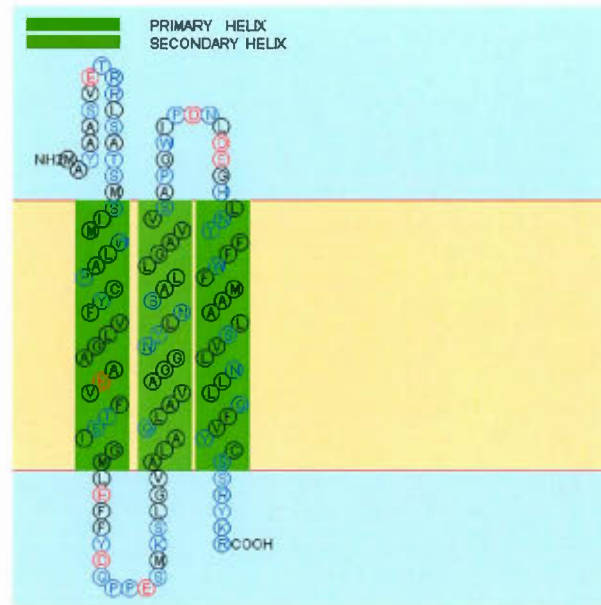


**Figure 3.31 : Représentation par le programme TMHMM des domaines de la protéine AAP53384.**



**Figure 3.32 : Représentation par le programme SOSUI des domaines transmembranaires de la protéine AAP53384.**

En vert sont représentées les hélices transmembranaires. En beige est représentée la bicouche lipidique de la membrane plasmique.



**Figure 3.33 : Représentation par le programme SOSUI des domaines transmembranaires de la protéine CD89431, protéine 49A1 hypothétique.**  
En vert sont représentées les hélices transmembranaires. En beige est représentée la bicouche lipidique de la membrane plasmique.

Un autre point intéressant est donné par l'analyse de la séquence promotrice disponible du gène annoté de riz AE017085 (**Figure 3.34**). Sur cette figure ont été présentés les éléments de régulation présents sur les 1000 paires de bases précédant le codon d'initiation ATG du gène. L'élément retrouvé le plus souvent est le site de fixation des DOF protéines (DOFCOREZM). Les protéines DOF sont des facteurs de transcription spécifiques des plantes. Ces protéines sont reconnues être des facteurs régulateurs des gènes impliqués dans le métabolisme du carbone. Cependant, la fréquence de cet élément de régulation peut s'expliquer par la courte séquence qui le constitue (quatre bases) et laisse en suspens la pertinence de cette séquence. Le gène annoté du riz ne pourrait très bien pas être impliqué dans le métabolisme du carbone.

Un autre élément de régulation souvent retrouvé est MYCCONSENSUSAT. Cet élément serait à relier au stress de sécheresse. La toxicité à l'aluminium conduit souvent à l'expression de nombreux gènes de stress biotique ou abiotique dont notamment le stress de sécheresse. Il n'est donc pas étonnant de trouver des éléments de régulation de ce stress. Ceci confirmerait le rôle de 49A1 dans les mécanismes de toxicité ou de tolérance au métal. Enfin, une analyse plus générale du chromosome 10 du riz a montré que AE017085 se situe entre une protéine inconnue et à 5000 paires de bases du précurseur de la  $\beta$ 1-3-Glucanase, un gène fortement induit par l'aluminium chez le blé sensible Victory (Cruz-Ortega *et al.*, 1997). Il y aurait donc une relation entre le locus de AE017085 et son rôle dans la réponse à l'aluminium.

```

1      TTGCCCTTCCCTCTCCAATCGTCCATCGCTCACTCTCCTCAGGTCTCATC
51     TCTCTCTCTCTCTCTCTCTCACCTGCTACTTTTGCTGGAATCGATGGCTTA
101    CATATGTTTTAGAGGATTTTAGGGATAGATAAAGCATGCTTGTGTCAG
151    GCCAAATCTTTCTTCATTTTGGAAATTAATACTGCACCTGAACTTTTTTT
201    GGATAAAAAAGAAAGTGTATCAGCTTTGAATGAAGCCTACTAGTTCTTTTA
251    TGAGTAGTGTGTGGTCAATTTCCCCTGGTTAAATGTGGGATGGATGTTT
301    GCTTCAAAGAAATAAAAGAAATGTGGGATGGACCTGATGGTTCAAGGCT
351    AATTTTGTTTTGACACTTCATTTCTTAGGTTTTTGGTGTGTTTGTGTTCA
401    AGATTGAATAGGACAAGACATAGGGGTTAGCTCTCAATTTAAATGCCCAA
451    GTTAAAAAGATTGTAATAATTGTCAAAAAAATTCATGGAATGCTTCCT
501    TCTCTAGAAAGTAGGAAGCTGACGGTCTGACCCCCAAAAAAAGGTCAG
551    TTTGTCCTCTCTGTTTTATGATAATTACTTTCCTAATTTCCCAGCTGA
601    CAGAAGGGTGTGCTTGCAAGAAATAGTTGTTTACAGAATTATGTAGTCA
651    ATAGAGTTCATATATAACTCCAGTACCAAAATTCGCGTGAATGTGCTAAT
701    CAAAATGCAGAATTGGATATGAGTAATCAATCAGAAAAAGTGCGAGTGAT
751    ATGCTAGTGGCCTAATGTCACTGAATTTTTCAGAAGACCAAGACAGCACAA
801    ATGGGTGTGTCGGGTATGTGATGCAATTTGTTAGATAATTTCTTATTTTA
851    TCTTCTAACAAATTTCTTATCTCATCATTGCCACATAGATGGCTTACGAA
901    AAATTCCTTAGGTGCAAGATTATACTGAATTAATGCAAGTAGCTTAGAG
951    TCGTCCGTTTTCTTCCAACAAAATTGCTGAAGAAGCCAGAGGCTCAAATG
1001   GAGGCATCTGATGAGGACAG

```

**Figure 3.34 : Analyse de la séquence promotrice du gène annoté de riz AE017085.**

~~TATAA~~ : TATA box

~~CACCTG~~ : Séquence de l'élément de régulation appelé "MYCCONSENSUSAT"

~~AAAG~~ : Séquence de l'élément de régulation appelé "DOFCOREZM"

~~ATG...~~ : début de la séquence codante du gène AE017085

(d'après PLACE, Higo *et al.*, 1999).

#### 3.3.4. POTENTIEL DE TOLÉRANCE DU GÈNE 49A1 DE BLÉ

Des expériences d'expression chez la levure du gène complet de Norstar homologue à 49A1 ont été effectuées (**Tableau 3.9**). Trois séries de mesures A, B et C ont été effectuées et la croissance des levures a été mesurée à différents temps par la densité optique à 600 nm. Un vecteur vide (pYES-DEST52) a été utilisé comme contrôle. Au bout de cinq jours de culture, pour les concentrations d'aluminium supérieures à 25  $\mu\text{M}$  d' $\text{Al}^{3+}$ , une différence sensible de densité optique est observée pour les levures exprimant le gène de Norstar homologue à 49A1. Cette différence modérée est de l'ordre d'un facteur 2 (2,19 à 75  $\mu\text{M}$  d' $\text{Al}^{3+}$ ). Ainsi, l'augmentation de densité optique étant à rattacher à la viabilité et la croissance des levures, le gène de Norstar homologue à 49A1 accorde donc une tolérance modérée envers l'aluminium à la levure.

**Tableau 3.9 : Tests de résistance à l'aluminium de levure exprimant le gène de Norstar homologue à 49A1.**

| A   | Al <sup>3+</sup> (μM) | DO 600nm |        |         |        |         |        |
|-----|-----------------------|----------|--------|---------|--------|---------|--------|
|     |                       | 2 jours  |        | 3 jours |        | 5 jours |        |
|     |                       | 49A1     | DEST52 | 49A1    | DEST52 | 49A1    | DEST52 |
| 0   | 0.291                 | 0.400    | 0.354  | 0.469   | 0.524  | 0.521   |        |
| 10  | 0.072                 | 0.068    | 0.265  | 0.379   | 0.511  | 0.543   |        |
| 25  | 0.074                 | 0.041    | 0.063  | 0.022   | 0.423  | 0.311   |        |
| 50  | 0.054                 | 0.034    | 0.051  | 0.050   | 0.142  | 0.084   |        |
| 75  | 0.038                 | 0.033    | 0.062  | 0.026   | 0.160  | 0.073   |        |
| 100 | 0.059                 | 0.007    | 0.044  | ----    | 0.188  | 0.112   |        |
| 150 | 0.043                 | 0.066    | 0.056  | 0.012   | 0.169  | 0.109   |        |
| 200 | 0.055                 | 0.031    | 0.044  | 0.014   | 0.175  | 0.106   |        |
| 300 | 0.063                 | 0.000    | 0.000  | 0.009   | 0.186  | 0.103   |        |

| B   |       | DO 600nm |        |         |        |         |        |
|-----|-------|----------|--------|---------|--------|---------|--------|
|     |       | 1 jour   |        | 3 jours |        | 6 jours |        |
|     |       | 49A1     | DEST52 | 49A1    | DEST52 | 49A1    | DEST52 |
| 0   | 0.187 | 0.184    | 0.354  | 0.469   | 0.460  | 0.477   |        |
| 10  | 0.182 | 0.175    | 0.262  | 0.379   | 0.488  | 0.511   |        |
| 25  | 0.185 | 0.162    | 0.063  | 0.022   | 0.419  | 0.367   |        |
| 50  | 0.203 | 0.163    | 0.051  | 0.050   | 0.146  | 0.068   |        |
| 75  | 0.210 | 0.198    | 0.062  | 0.026   | 0.113  | 0.048   |        |
| 100 | 0.187 | 0.181    | 0.044  | 0.030   | 0.108  | 0.080   |        |
| 150 | 0.188 | 0.163    | 0.056  | 0.012   | 0.132  | 0.055   |        |
| 200 | 0.167 | 0.184    | 0.044  | 0.014   | 0.098  | 0.041   |        |
| 300 | 0.208 | 0.174    | 0.000  | 0.009   | 0.097  | 0.012   |        |

| C   |  | DO 600nm |        |      |        |       |        |
|-----|--|----------|--------|------|--------|-------|--------|
|     |  | 8 jours  |        |      |        |       |        |
|     |  | 49A1     | DEST52 | 49A1 | DEST52 | 49A1  | DEST52 |
| 0   |  |          |        |      | 0.477  | 0.498 |        |
| 10  |  |          |        |      | 0.487  | 0.548 |        |
| 25  |  |          |        |      | 0.454  | 0.424 |        |
| 50  |  |          |        |      | 0.102  | 0.061 |        |
| 75  |  |          |        |      | 0.095  | 0.074 |        |
| 100 |  |          |        |      | 0.108  | 0.057 |        |
| 150 |  |          |        |      | 0.100  | 0.058 |        |
| 200 |  |          |        |      | 0.058  | 0.048 |        |
| 300 |  |          |        |      | 0.094  | 0.043 |        |

Trois séries d'expériences (A, B et C) ont conduit à faire croître 2 populations de levures (l'une transformée avec un vecteur permettant l'expression de l'ADNc 49A1 de Norstar, l'autre avec le vecteur contrôle vide DEST52). Les levures ont poussé pendant plusieurs jours à différentes concentrations d'aluminium allant de 0 μM à 300 μM. La croissance a été estimée en mesurant la densité optique à 600 nm.

### 3.4. BANQUES DE PROTÉINES GATEWAY

Des améliorations apportées à la technique d'Hybridation Suppressive Soustractive (SSH) ont permis d'isoler le gène 49A1 dont l'expression est induite par l'aluminium. L'utilisation de la SSH devait répondre aux deux premières hypothèses quant à la nature des gènes de tolérance. En effet, ces gènes peuvent être :

- (i) des gènes spécifiques des variétés tolérantes
- (ii) des gènes présents chez les variétés tolérantes et sensibles mais régulés de façon différentes
- (iii) des isoformes de gènes dont celles présentes dans les variétés tolérantes confèreraient la résistance au métal

Afin de répondre aussi à l'hypothèse d'isoformes de gènes pouvant conférer le phénotype de tolérance au métal, des banques de protéines de deux plantes tolérantes, blé et riz, ont été exprimées chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

Toute cette partie des travaux résulte d'une collaboration avec Josée Demers, étudiante à la Maîtrise de l'Université du Québec à Montréal et Jeffrey P. Jonston (Ph. D) des services du support technique d'INVITROGEN Canada.

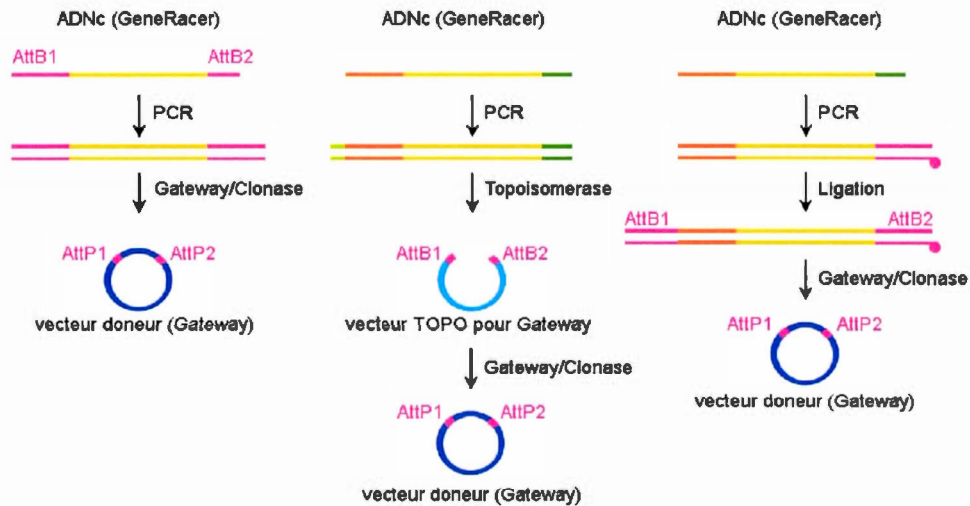
Les banques d'expression devaient être facilement transférables de la levure vers les plantes pour réaliser dans un futur proche des expressions à grande échelle directement chez *Arabidopsis thaliana*. Le système Gateway d'INVITROGEN a été choisi comme alternative pour permettre d'exprimer une même banque chez plusieurs organismes. De plus, ces banques devaient garantir un très fort enrichissement en ADNc de pleine longueur (*full-length*) dans le but d'avoir des traductions correctes des gènes. Trois stratégies ont été élaborées suivant des procédés expérimentaux différents afin de réaliser ces banques. Les difficultés reposaient essentiellement sur l'utilisation à grande échelle du système Gateway d'INVITROGEN.

#### 3.4.1. PREMIÈRE STRATÉGIE : INSERTION DES SÉQUENCES ATTb1 ET ATTb2 PAR GENERACER.

Les premières tentatives de construction ont consisté à remplacer l'ARN oligo du kit GeneRacer d'INVITROGEN par un nouveau ARN oligo possédant la séquence Attb1 et ce afin d'effectuer une PCR directement avec des amorces ayant les séquences Attb1 et Attb2 (schéma de gauche, **Figure 3.35**).

Ces tentatives ont été vouées à l'échec par la formation en 5' et 3' des amplifiats de conglomérat de séquences Attb1 et Attb2 enchevêtrées. Ceci pouvait s'expliquer par une très faible différence entre les séquences Attb1 et Attb2 (trois bases seulement) conduisant à des hybridations aspécifiques et l'utilisation d'une ADN polymérase correctrice (afin d'obtenir des séquences fiables d'ADNc) capable de réarranger les séquences. Plusieurs améliorations ont été tentées pour remédier à ce problème lors de la PCR. Une élévation de la température d'hybridation et le remplacement de l'ADN polymérase correctrice par une ADN polymérase sans activité exonucléase a permis de réduire les enchevêtrements des séquences Attb1 et Attb2 mais n'a pas permis d'éviter la fixation d'amorces Attb2 sur les sites Attb1 et inversement posant donc le problème du clonage orienté.





**Figure 3.35 : Les trois protocoles tentés pour réaliser les banques d'expression Gateway.**

#### 3.4.2. DEUXIÈME STRATÉGIE : UTILISATION D'UN VECTEUR GATEWAY OUVERT PAR DES TOPOISOMÉRASES.

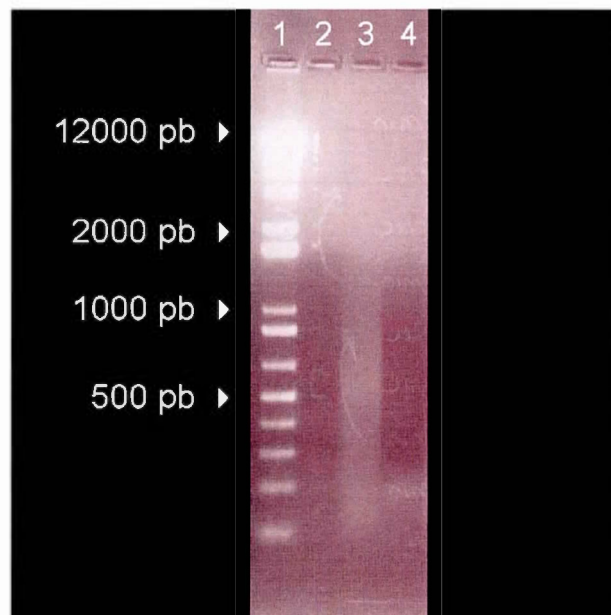
La deuxième stratégie a consisté à réaliser le kit GeneRacer comme proposé par le fournisseur et de cloner les amplifiats PCR obtenus dans un vecteur ouvert par des topoisomérases mais possédant de façon orientée les séquences AttB1 et AttB2 (vecteur TOPO –Gateway d'INVITROGEN) (schéma du centre, **Figure 3.35**).

Ce nouveau protocole s'est heurté à la faible efficacité de clonage. Le rendement ne permettait pas de cloner raisonnablement une banque, et seul un nombre restreint de clones positifs était obtenu après étalement. Cette stratégie de clonage est donc valable pour l'expression de gène au cas par cas mais elle se bute à sa faible efficacité d'incorporation pour des banques d'ADNc. De plus, cette stratégie est fort coûteuse puisque les vecteurs ouverts par les topoisomérases sont vendus en faible quantité et à des prix prohibitifs.



### 3.4.3. TROISIÈME STRATÉGIE : INSERTION DES SÉQUENCES ATTB1 ET ATTB2 EN DEUX TEMPS

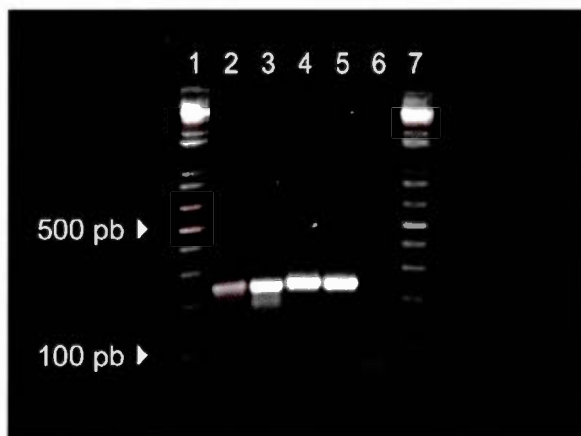
Une troisième et dernière stratégie a été mise au point. Elle consistait à ajouter les séquences AttB1 et AttB2 en deux temps (schéma de droite, **Figure 3.35**). La séquence AttB2 est ajoutée par l'utilisation d'une amorce 3' modifiée lors des étapes de PCR GeneRacer. En plus de comporter la séquence AttB2, cette amorce 3' possède également une biotine fixée en 5'. Ainsi lorsque la séquence AttB1 est insérée à l'aide d'un adaptateur, celui-ci ne peut se fixer qu'en 5' des ADNc. Une fois cette ligation réalisée, les ADNc sont insérés dans le vecteur Gateway par une réaction BP. Cette dernière stratégie a permis de construire deux banques : une banque d'ADNc d'Atlas-66 exposé à 50  $\mu\text{M}$  d'Al et une banque d'ADNc de riz exposé à 200  $\mu\text{M}$  d'Al.



**Figure 3.36** : Gel d'agarose des produits PCR GeneRacer de Fundy exposé à 5  $\mu\text{M}$  d' $\text{Al}^{3+}$ .

Piste 1 : marqueur de taille moléculaire ; piste 3 : produits PCR GeneRacer de Fundy exposé à 5  $\mu\text{M}$  d' $\text{Al}^{3+}$  ; piste 4 : contrôle négatif (eau).

La **Figure 3.36** montre les profils des produits PCR obtenus. Une traînée allant de 150 paires de base à 10000 paires de base environ était observée avec des bandes plus intenses entre 500 à 1000 paires de bases. Cette traînée correspond bien aux tailles des ARNm avec une plus grande intensité entre 500 à 1000 paires de base qui correspond à la taille moyenne d'une grande majorité d'ARNm exprimés. A chaque étape du protocole (produits GeneRacer, banque "Entrée", banque "Expression"), les produits ont aussi été testés par PCR pour évaluer l'abondance des deux gènes faiblement exprimés 48E8 et 49A1 afin de valider la qualité des banques réalisées. Les deux gènes ont toujours été détectés de façon raisonnable comme décrit dans la **Figure 3.37**.



**Figure 3.37 : Tests PCR effectués sur les produits GeneRacer de Fundy.**

Piste 1 & 7 : marqueur de taille moléculaire ; 2 : test PCR 49A1 sur les produits GeneRacer de Fundy ; 3 : contrôle positif du test 49A1 (plasmide dilué) ; 4 : test PCR 48E8 sur les produits GeneRacer de Fundy ; 5 : contrôle positif du test 48E8 (plasmide dilué) ; 6 : contrôles négatifs des tests (eau).

Les levures transformées ont été sélectionnées pour leur résistance au métal en milieu liquide. Deux séries de transformations ont été effectuées pour évaluer la viabilité des cellules (**Tableau 3.10**). Des différences très significatives de croissance ont été observées. Comparativement au contrôle pDES-YEST52 avec une densité

optique de croissance cellulaire (à 600 nm) proche de 0 pour des conditions d'exposition au métal de 100  $\mu\text{M}$ , les levures transformées avec les banques de riz et de blé présentaient des densités optiques à 600 nm de l'ordre de 0,3 et 0,4 respectivement démontrant la présence de clones résistants au métal et continuant à croître. Des clones ont alors été isolés sur milieu solide, leur ADN plasmidique extrait et re-inséré dans *E. coli* pour être séquencé (**Tableau 3.11**). Les séquences de quatre clones de blé et d'un clone de riz ont pu être obtenues. De façon remarquable, ces séquences étaient toutes identiques même entre le clone de riz et ceux de blé. Une faible homologie de séquence est apparue avec le gène *StAAP1* de pomme de terre (**Tableau 3.12**). *StAAP1* code pour un transporteur d'acide aminé proton dépendant (**Koch et al., 2003**). Il appartient à la même famille de gènes que les transporteurs d'auxine tel que *AUX1* (**Koch et al., 2003**), une hormone qui aurait son rôle à jouer dans le processus d'inhibition de la croissance des racines.

**Tableau 3.10 : Tests de viabilité des différentes banques Gateway.**

|                                      | DO 600 nm              |                        |
|--------------------------------------|------------------------|------------------------|
|                                      | 1 <sup>ère</sup> série | 2 <sup>ème</sup> série |
| Contrôle négatif (pYes-dest52):      |                        |                        |
| Piquage 1 (dil. 1/10) avec 75 uM Al  | 0.181                  | 0.085                  |
| Piquage 2 (dil. 1/10) avec 75 uM Al  | 0.025                  | 0.007                  |
| Piquage 3 (dil. 1/10) avec 100 uM Al | 0.005                  | 0                      |
| Piquage 4 (dil. 1/10) avec 100 uM Al | -                      | 0                      |
| Banque Blé:                          |                        |                        |
| Piquage 1 (dil. 1/10) avec 75 uM Al  | 0.250                  | 0.200                  |
| Piquage 2 (dil. 1/10) avec 75 uM Al  | 0.271                  | 0.210                  |
| Piquage 3 (dil. 1/10) avec 100 uM Al | 0.292                  | 0.252                  |
| Piquage 4 (dil. 1/10) avec 100 uM Al | -                      | 0.222                  |
| Banque Riz:                          |                        |                        |
| Piquage 1 (dil. 1/10) avec 75 uM Al  | 0.240                  | 0.203                  |
| Piquage 2 (dil. 1/10) avec 75 uM Al  | 0.350                  | 0.237                  |
| Piquage 3 (dil. 1/10) avec 100 uM Al | 0.399                  | 0.427                  |
| Piquage 4 (dil. 1/10) avec 100 uM Al | -                      | 0.386                  |

L'expression de protéines codées dans deux banques d'ADNc, l'une de blé, l'autre de riz, a été induite afin d'observer si certains clones pouvaient apporter une résistance à l'aluminium. Cette tolérance au métal a été évaluée par la mesure de la densité optique à 600 nm correspondant au taux de croissance des levures mises en présence du métal (le vecteur pYes-dest52 servant de contrôle). Les mesures au spectrophotomètre ont été réalisées dans des intervalles de 5 jours. Deux séries de mesures ont été faites pour démontrer la reproductibilité des résultats.

**Tableau 3.11 : Séquences des clones positifs isolés.**

| Clones | Séquences                                                                                                                                 |
|--------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 2B1    | Attb1_TCGACTGGAGCACGAGGACACTGACATGGACTGAAGGAGTAGAA<br>AAAAAAAAAAAAAAAAAACTGTCATGCCGTTACGTAGCGTATCGTTGACAG<br>C Attb2                      |
| 2B3    | Attb1_TCGACTGGAGCACGAGGACACTGACATGGACTGAAGGAGTAGAA<br>AAAAAAAAAAAAAAAAAACTGTCNTGCCGTTACGTAGCGTATCGTTGACAG<br>C Attb2                      |
| 2B4    | Attb1_TCGACTGGAGCACGAGGACACTGACATGGACTGAAGGAGTAGAA<br>AAAAAAAAAAAAAAAAAACTGTCNTGCCGTTTACGTAGCGTATCGTTGACA<br>GC Attb2                     |
| 2B6    | Attb1_TCNACTGGGAGCACGAGGGACACTGGACATGGGACTGGAAGGAG<br>TATAAAAAAAAAAAAAAAAAAACTGGTCNTGCCGTTACGTAGCGTATCGT<br>TGACAGC Attb2                 |
| 1R1    | Attb1_TCGACTGGAGCACGAGGACACTGACNTGGACTGAAGGAGTAGAA<br>AAAAGAANGGAAGAGAAGAGGAAAAAAAAAAAAAAAAAACTGTCNTGC<br>CGTTACGTAGCGTATCGTTGACAGC Attb2 |

**Tableau 3.12 : Homologies de séquences de ADN isolés.**

| Clones                    | Homologies de séquences                                                              |
|---------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| 2B1 2B2<br>2B3 2B4<br>2B6 | Solanum tuberosum mRNA for amino acid transporter (aap1 gene)<br>Expect = $2e^{-14}$ |
| 1R1                       | Solanum tuberosum mRNA for amino acid transporter (aap1 gene)<br>Expect = $7e^{-15}$ |

**Tableau 3.13 : Tests de tolérance de clones positifs isolés après trois jours d'exposition.**

| Al ( $\mu$ M) | DO 600 nm |       |       |       |       |       |
|---------------|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|
|               | DEST52    | 2B1   | 2B2   | 2B3   | 2B6   | 1R1   |
| 0             | 0.50      | 0.425 | 0.483 | 0.481 | 0.419 | 0.504 |
| 50            | 0         | 0.018 | 0.01  | 0.139 | 0.104 | 0.089 |
| 100           | 0.017     | 0.01  | 0     | 0.049 | 0.05  | 0     |
| 150           | 0.012     | 0.005 | 0     | 0.077 | 0     | 0.014 |

Cependant, selon les traductions en acides aminés obtenus par informatique, les séquences des cinq clones positifs obtenus ne produiraient que de petits oligopeptides de 16 acides aminés. La tolérance apportée par ces plasmides a été réévaluée en transformant ces ADN de nouveau dans les levures (**Tableau 3.13**). Une résistance a été observée pour les clones 2B3, 2B6 et 1R1 à 50  $\mu$ M d'Al mais peu à

100  $\mu\text{M}$ . Ces expériences d'évaluation de la tolérance apportée par l'expression de ces courtes séquences nucléotidiques n'ont été effectuées qu'une seule fois et de futures mesures sont nécessaires pour confirmer ces résultats. Il est cependant intéressant de noter que ces clones présentent là encore des homologies de séquences avec des transporteurs d'oligo-peptide proton dépendants comme pour 49A1. Il y aurait peut-être une relation étroite avec ces genres de transporteurs et les mécanismes de tolérance à l'aluminium.

Toutefois, les taux de croissance observés avec les clones 2B3, 2B6 et 1R1 sont nettement inférieurs à ceux affichés par les banques de protéines de blé et de riz. Ainsi, les clones conférant les grandes résistances au métal présents dans les banques ne seraient pas encore été isolés.

## CHAPITRE IV

### DISCUSSION

Les travaux de cette thèse visaient à identifier les gènes impliqués dans les mécanismes de tolérance à l'aluminium chez le blé tolérant Atlas-66 et le riz. Deux principaux procédés de biologie moléculaire ont été utilisés afin d'isoler de tels gènes : l'Hybridation Suppressive Soustractive (SSH) et des banques d'expression de protéines chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

#### 4.1. LE GÈNE 49A1

##### 4.1.1. DÉRÉGULATION DU GÈNE 49A1

Plusieurs milliers de clones ont été testés à travers les différentes banques SSH réalisées au cours de cette thèse et environ un million de clones ont été étudiés lors des banques d'expression de protéines chez la levure. Seul le gène 49A1 isolé par SSH a été validé par PCR en temps réel comme étant surexprimé chez la population d'ADNc du blé tolérant Atlas-66 exposé à 50  $\mu\text{M}$  d'aluminium comparativement à la population d'ADNc du blé sensible Fundy exposé à 5  $\mu\text{M}$  d'aluminium. Ces concentrations d'aluminium correspondent respectivement à un état de stress

d'environ 50% d'inhibition de croissance des racines chez les deux types de blé. De plus, des expériences de transgénèse ont montré qu'un homologue du gène 49A1 issu du blé Norstar conférait une résistance modérée à la levure lorsqu'elle était exposée au métal. Malheureusement, toutes les tentatives pour isoler l'ADNc complet du gène 49A1 ont échoué. Toutefois, un EST codant pour un gène entier présentant une forte homologie à 49A1 est maintenant disponible via le consortium Genoplant.

Le gène 49A1 est induit par l'aluminium chez les blés tolérants. Son augmentation relative par rapport au gène témoin *GA<sub>3</sub>PDH* cytosolique est de l'ordre d'un facteur 2 à 10 selon les expériences menées. Dernièrement, **Chen *et al.* (2005)** ont démontré une augmentation de l'activité de l'enzyme *GA<sub>3</sub>PDH* chloroplastique chez les feuilles de citrus exposées à l'aluminium. Il est à noter que ces auteurs ont testé leur enzyme selon le protocole de **Leegood (1990)** : ils ont mesuré l'activité de l'enzyme EC 1.2.1.13 chloroplastique (et non l'enzyme cytoplasmique EC 1.2.1.12 comme il est écrit dans leur partie matériel et méthode suite à une erreur typographique). En **1978**, **Cerff** a mis en évidence des comportements différents entre les formes cytoplasmiques des enzymes *GA<sub>3</sub>PDH* impliquées dans la glycolyse (EC 1.2.1.12) des formes enzymatiques chloroplastiques impliquées dans le cycle de Calvin de la photosynthèse (EC 1.2.1.13). En effet, en présence de NAD, la forme cytoplasmique reste soluble alors que la forme chloroplastique s'agrège. Ce n'est que lorsque du NADP est rajouté que l'enzyme chloroplastique est resolubilisée. Ces propriétés physico-chimiques ont d'ailleurs permis de mettre au point des procédés de purification des 2 formes de *GA<sub>3</sub>PDH* (**Cerff, 1979** ; **Cerff, 1982**). De plus, des études plus poussées ont montré que les séquences nucléiques et protéiques des 2 formes présentaient de faible homologie. Par exemple, chez la moutarde, **Martin et Cerff (1986)** ont démontré que les 2 formes avaient 55% d'homologie en ADN et 49% en séquence d'acides aminés. Il est donc peu probable que la forme cytoplasmique démontre une activité augmentée en présence d'aluminium comme la forme chloroplastique. De plus, il est reconnu que l'activité et le taux de transcription de la forme cytoplasmique sont peu variables et robustes vu que cette enzyme est



impliquée dans la glycolyse, une réaction très importante pour la cellule. De même, une augmentation de l'activité n'implique pas forcément une augmentation des transcrits. Enfin, si le niveau de transcrits de la forme cytosolique augmentait comme cela est le cas pour la forme chloroplastique, cela signifierait que l'augmentation des transcrits du gène 49A1 serait beaucoup plus importante que celle observée et qu'elle a été sous-estimée durant les expériences de PCR en temps réel. Malgré les nouveaux résultats de **Chen *et al.* (2005)**, il apparaît bien que le gène 49A1 soit sur-exprimé par l'aluminium. Ceci est d'ailleurs vérifié lorsque le gène *War 7.2* est utilisé comme contrôle, un gène précédemment observé comme étant sur-exprimé par l'aluminium (**Hamel *et al.*, 1998 ; Figure 3.3 et Figure 3.23**).

Des gènes faiblement homologues à 49A1 ne sont retrouvés que 0 à 3 fois dans les banques d'EST de différentes plantes (mais pas de blé) disponibles sur Internet. Le gène 49A1 est donc peu représenté dans les banques de gènes allant dans le sens qu'il constitue un gène très faiblement exprimé. Aucune séquence de forte homologie n'avait été obtenue précédemment. Tout récemment, un EST isolé de blé identifié par le consortium Genoplant a permis d'identifier un gène fortement homologue à 49A1. Cet EST représente à ce jour la seule séquence de forte homologie avec 49A1. De l'analyse de cette séquence, il en est ressorti que 49A1 coderait pour une petite protéine présentant trois hélices trans-membranaires. Aucun exemple de gène comparable au gène 49A1, dérégulé spécifiquement chez une variété tolérante de blé n'est décrit dans la littérature à ce jour. Le seul gène de tolérance clairement identifié chez le blé est le gène *ALMT1* qui est constitutivement sur-exprimé chez les blés tolérants.

#### 4.1.2. LA PROTÉINE 49A1

Le gène 49A1 appartiendrait aux protéines POT. Les protéines POT (transporteur d'oligopeptide proton dépendant ou *proton dependent oligopeptide transport*) ou PTR ont été regroupées selon des homologies de séquences en une famille distincte par **Paulsen et Skurray (1994)**. Elles auraient la possibilité de transporter des acides aminés, des di-peptides voir des tri-peptides. Un des premiers gènes POT isolés fût le gène PTR2 de levure (**Perry et al., 1994**). Des homologues ont été par la suite trouvés chez *Arabidopsis thaliana* (**Song et al., 1996**) ainsi que chez d'autres types de plantes comme l'orge (**West et al., 1998**). Cependant, les protéines POT peuvent aussi transporter d'autres molécules que des oligo-peptides tels que le nitrate ou le nitrite. Les travaux récents de **Lin et al. (2000)** montrent d'ailleurs que leur transporteur OsNRT1 de riz transportant le nitrate possède une forte affinité pour celui-ci mais est incapable de transporter des oligo-peptides. Les auteurs ont aussi constaté qu'il présentait une plus forte homologie de séquence avec d'autres transporteurs de peptides qu'avec les autres transporteurs de nitrate. Ils en concluent que l'étude de la séquence seule ne permet pas de prédire quelle molécule est transportée. Le gène 49A1 présente une homologie de domaine avec PTR2 mais cela ne signifie pas, d'après les travaux de **Lin et al. (2000)**, qu'il soit nécessairement un transporteur d'oligo-peptide. Plusieurs hypothèses peuvent être posées par rapport à la problématique sur l'aluminium : 49A1 pourrait être (i) un transporteur d'aluminium ou (ii) un transporteur au malate, l'acide organique sécrété par les blés tolérants. Toutefois, si 49A1 appartient à la famille des POT protéines, son activité de transport impliquerait des protons et mettrait en jeu des activités proton-ATPases.

La nature du gène 49A1 comme un gène PTR (ou POT) présentant des homologies de domaine avec la protéine PRT2 peut être aussi rapprochée des mécanismes de tolérance au nickel identifiés par **Krämer et al. (1996)**. En effet ces auteurs ont clairement démontré que la résistance au nickel serait liée à la sur-expression d'histidine libre chélatant le métal chez de nombreux types de plantes. Une

fois chélaté, le métal est transporté et stocké dans les appareils aériens via des transporteurs spécifiques. De façon surprenante, il a été démontré que les transporteurs à histidine présentent des homologies avec les domaines protéiques PTR2 (Yamashita *et al.*, 1997). Le gène 49A1 pourrait donc être un gène de tolérance à l'aluminium qui présenterait des similitudes fonctionnelles avec les mécanismes de tolérance au nickel, c'est-à-dire un transport d'un acide aminé ou d'un polypeptide complexé ou non avec le métal et permettant ainsi une détoxification de la plante.

Le malate, dont la sécrétion induite par l'aluminium semble être un mécanisme de défense des blés tolérants, présente des similitudes moléculaires avec l'acide aminé aspartate (Erreur ! Source du renvoi introuvable.). Ces similitudes seraient d'autant plus grandes lorsque le malate serait complexé à l'aluminium ou réduit par des protons : il y aurait des répartitions de charges ressemblant à celles d'un acide aminé. L'électroneutralité devant être maintenue, la sécrétion d'acides organiques, molécules chargées négativement, doit être compensée par un influx d'anions ou l'efflux de cations. Deux mécanismes d'efflux de cations sont actuellement proposés pour compenser la sortie des acides : (i) efflux de proton via des proton-ATPases et (ii) l'efflux de potassium (Ryan *et al.*, 2001). Les scientifiques ne s'entendent pas sur cette dernière hypothèse : certains trouvent un efflux de potassium induit par l'aluminium (Ryan *et al.*, 1995 ; Kollmeier *et al.*, 2001) alors que d'autres, incluant cette même équipe (Ryan *et al.*), constatent une inhibition de l'efflux de potassium par le métal (Ryan *et al.*, 1997 ; Piñeros et Kochian, 2001) selon les plantes étudiées.



**Figure 4.1 : Structures moléculaires de l'aspartate et du malate.**

Dernièrement **Ohno *et al.* (2003)** ont montré chez un mutant de carotte sur-excrétant du citrate, que la sécrétion d'acide organique était corrélée à un efflux de proton. Ils ont aussi observé une prise de potassium. Ces auteurs ont aussi mis en évidence une augmentation de l'activité des proton-ATPases membranaires d'un facteur trois chez les cellules de ce mutant comparativement aux cellules de carottes sauvages. Le fait que la sécrétion de citrate soit corrélée à l'efflux de proton et que les activités des pompes soient augmentées d'un facteur trois peut être rapproché du fait que le gène 49A1 semble être un transporteur proton dépendant et montre une augmentation du taux de ses ARN transcrits d'un facteur de deux à dix chez les variétés tolérantes de blé exposées à l'aluminium.

Un article publié en février 2005 mettait en avant le rôle d'un gène dans le transport de l'aluminium chez *Arabidopsis thaliana* (**Larsen *et al.*, 2005**). Ce gène *ALS3* est impliqué dans le transport du métal des régions sensibles que sont les apex racinaires vers des régions moins sensibles que sont les racines âgées et les appareils aériens (tiges et feuilles). Ce gène code pour un ABC (*ATP binding cassette*) transporteur membranaire. Ces résultats rejoignent les observations faites chez le thé où les feuilles âgées sont utilisées comme lieux de stockage pour détoxifier la plante.

En résumé, à travers ces travaux et ceux de **Delhaize *et al.* (2004)** et **Larsen *et al.* (2005)**, deux types de mécanismes de résistance à l'aluminium se distinguent et ont été validés expérimentalement. Le premier implique un transport basipétal (des apex racinaire vers les appareils aériens) de l'aluminium. Ce mécanisme de défense serait retrouvé chez tous les types de plantes et constituerait un mécanisme général de détoxification. Il impliquerait l'intervention de transporteurs trans-membranaires spécifiques à l'aluminium. Le deuxième consiste en une sécrétion d'acides organiques. Ce mécanisme de résistance serait spécifique des variétés tolérantes. Les acides organiques ainsi sécrétés immobilisent l'aluminium à l'extérieur des organes, en particulier les apex racinaires, organes très sensibles au métal. Ce mécanisme ferait intervenir des transporteurs membranaires aux acides organiques dont l'activité serait induite par la présence du métal dans les sols.

En somme, plusieurs mécanismes peuvent donc être proposés pour la fonction du gène 49A1 :

- (i) 49A1 pourrait être un transporteur d'un acide aminé ou d'un polypeptide chélatant l'aluminium comme cela est le cas pour la résistance au nickel où de l'histidine libre chélate le métal présent à des taux toxiques. Comme il semblerait que ce soit le cas pour l'histidine, ces transporteurs présenteraient des activités ATPases proton dépendantes. Le transport pourrait se faire vers l'extérieur des racines ou, comme cela est le cas pour le nickel, vers les vacuoles des appareils aériens.
- (ii) 49A1 pourrait co-transporter le malate couplé à l'aluminium. Un jeu de pompes à protons ATP dépendantes permettrait de conserver l'électroneutralité et/ou participeraient à la désacidification intracellulaire.
- (iii) 49A1 ne serait qu'un transporteur au malate strict. Le malate excrété chélaterait l'aluminium à l'extérieur des cellules. Ce transport actif

nécessiterait de l'ATP et impliquerait le co-transport de protons permettant ainsi de conserver l'électroneutralité membranaire.

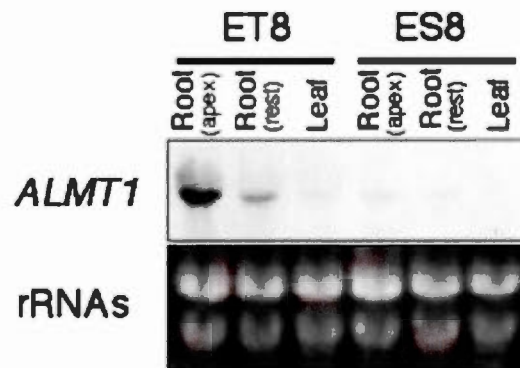
- (iv) 49A1 pourrait être aussi un transporteur membranaire strictement de l'aluminium comme le gène *ALS3* d'*Arabidopsis thaliana*. Ce transport actif impliquerait des activités ATPases proton dépendantes.
- (v) enfin 49A1 pourrait être un régulateur de l'un de ces types de transporteurs.

Des études de transformation de l'EST CD89431 chez la levure ou des plantes devraient apporter des réponses sur le rôle de 49A1 dans la tolérance au métal. En effet, cet EST isolé par le consortium Genoplant peut être directement utilisé puisqu'il possède une séquence Kozak et la séquence entière de la protéine associée. Le premier effet vérifiable pourrait être l'apport d'une résistance au métal certainement plus importante que celle obtenue avec l'homologue du blé Norstar (AE017085). Des expériences de fusion à la GFP pourraient aussi valider la position intramembranaire de la protéine. Des transformations dans des ovocytes de *Xenopus* pourraient permettre de vérifier si ce gène code pour un transporteur et de connaître la nature de la molécule transportée par la protéine CD89431.

#### 4.1.3. LE GÈNE ALTM1

Depuis plusieurs années, des études par patch-clamp et l'utilisation d'inhibiteurs de canaux ioniques ont permis de mettre en évidence le rôle d'un transporteur à anions dans la sécrétion de malate chez le blé (Ryan *et al.*, 1995b ; Ryan *et al.*, 1997) et la sécrétion de citrate et de malate chez le maïs (Kollmeier *et al.*, 2001 ; Piñeros et Kochian, 2001) mais ces travaux n'ont pas permis d'identifier la nature de ces transporteurs. Des travaux utilisant également la technique SSH entre les blés tolérants ET8 et sensibles ES8 indifféremment exposés à 50  $\mu$ M d'aluminium

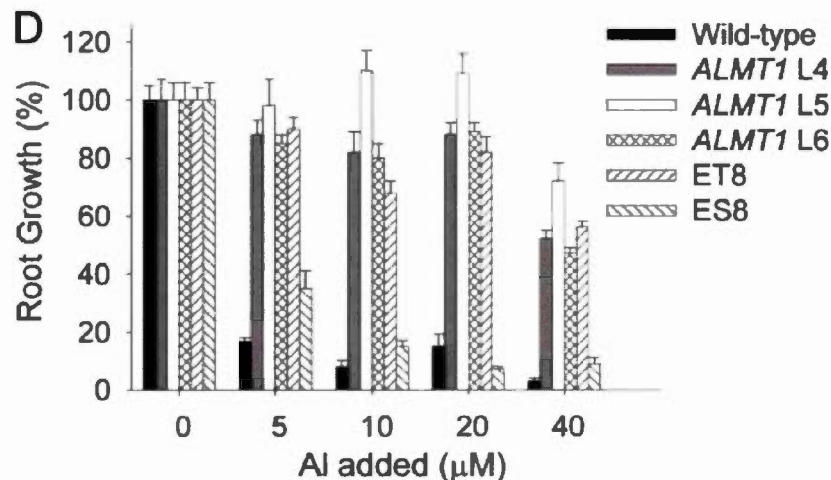
ont permis d'isoler un gène, le gène *ALMT1*, qui est moins exprimé constitutivement chez les variétés de blés sensibles que chez les blés tolérants (Sasaki *et al.*, 2004 ; Figure 4.2).



**Figure 4.2 : Northern blot du gène *ALMT1*.**

Des graines des variétés isogéniques ET8 (tolérantes) et ES8 (sensibles) ont été traitées à 50  $\mu\text{M}$  d' $\text{AlCl}_3$  pendant 2 heures puis les ARN ont été extraits de différents organes : 5 mm des apex racinaires (roots), le reste des racines (rest) et des feuilles (leaf). Dix microgrammes d'ARN ont été déposés par piste. Le gène *ALMT1* semble moins exprimé chez la variété sensible ES8 (piste 4) que chez la variété tolérante ET8 (piste 1) pour une même concentration de 50  $\mu\text{M}$  d'Al. (d'après Sasaki *et al.*, 2004).

Les auteurs ont réalisé des expériences de surexpression chez des cultures cellulaires de tabac et ont observé une diminution d'environ 50% du taux d'aluminium présent dans les cellules. Chez le riz, la surexpression d'*ALMT1* conduisait à une augmentation du malate sécrété mais aucune augmentation de la résistance au métal n'avait été constatée certainement à cause de l'importante résistance naturelle de cette plante au métal.



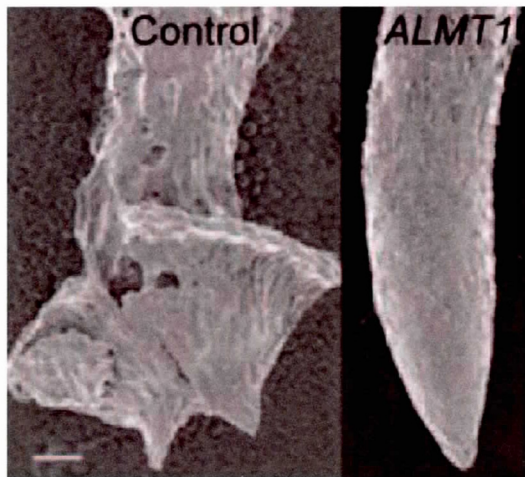
**Figure 4.3 : Quantification de l'inhibition de croissance racinaire des orges transgéniques surexprimant le gène de blé ALMT1.**

L'élongation racinaire a été évaluée pour la deuxième génération des orges transgéniques L4 à L5 surexprimant le gène *ALMT1* et pour les blés isogéniques ET8 tolérants et ES8 sensibles. A 40µM d'aluminium en milieu hydroponique, les orges transgéniques sont aussi résistantes (voir plus pour le transgénique ALMT1 L5) que le blé tolérant ET8. L'orge sauvage ne pousse quasiment pas à cette concentration élevée ainsi que le blé sensible ES8.

(d'après Delhaize *et al.*, 2004, figure 4 D).

Un autre article publié par ces mêmes équipes de chercheurs a démontré que ce gène *ALMT1* apportait une grande résistance à l'orge, une céréale très sensible naturellement à l'aluminium (Delhaize *et al.*, 2004). Les niveaux de résistance apportés étaient comparables à ceux des variétés tolérantes sauvages de blé (Figure 4.3). Les plantes transformées sécrétaient une grande quantité de malate au niveau de leurs apex racinaires. De plus, les apex des plantes transgéniques conservaient une morphologie normale en présence d'aluminium comparativement aux plantes sauvages (Figure 4.4). Enfin, l'activité de ce transporteur était directement induite par la présence du métal dans le milieu de culture. Le gène *ALMT1* représente ainsi le premier gène de résistance à l'aluminium dont le rôle a été validé.





**Figure 4.4 : Balayage électronique d'apex racinaire de l'orge transgénique ALMT1 L5.**

L'orge contrôle à gauche (transgénique avec un vecteur vide) et l'orge transgénique ALMT1 L5 ont été exposés à 3  $\mu$ M d'aluminium pendant 10 jours consécutifs.

Échelle : 100 $\mu$ M.

(d'après Delhaize *et al.*, 2004, figure 4 C)

Des homologues à *ALMT1* ont été recherchés chez *Arabidopsis thaliana* à travers 9 différentes variétés (Hoekenga *et al.*, 2006). Huit gènes homologues à *ALMT1* ont été identifiés à travers le génome de la plante mais un seul présentait une expression au niveau des racines, *AtALMT1*. L'atténuation de ce gène par *knockout* conduisait à une haute sensibilité de la plante au métal. Cependant, aucune corrélation dans le niveau d'expression de ce gène n'a pu être établie parmi les 9 variétés. En effet, l'expression induite par l'aluminium de ce gène était beaucoup plus forte chez les variétés moyennement tolérantes ou sensibles que chez les variétés tolérantes (Figure 4.5). Il est à noter que, chez le blé, l'expression d'*ALMT1* est constitutivement plus importante chez les variétés tolérantes que les variétés sensibles (Sasaki *et al.*, 2004 ; Figure 4.2). Les auteurs ont aussi vérifié que cette différence n'était pas due à un polymorphisme en complétant le mutant atténué de la variété tolérante

d'*Arabidopsis Columbia* avec le gène de la variété sensible *Landsberg erecta*. Ils ont observé une restauration complète du niveau de tolérance de la variété tolérante *Columbia* signifiant que *AtALMT1* est un gène important pour la tolérance mais que des mécanismes en amont du gène constituent les événements majeurs de la différence génotypique des variétés. De plus, le niveau de sécrétion de malate de ce mutant complétement était équivalent de celui de la variété tolérante sauvage *Columbia* et non du niveau plus faible de la variété sensible *Landsberg erecta* suggérant une régulation en amont du gène *AtALMT1*, et que *AtALMT1* ne constituerait pas le gène du contrôle de la tolérance au métal. Enfin, sa position chromosomique ne correspond pas avec le QTL majeur de la tolérance à l'aluminium chez *Arabidopsis* qui semble présent sur le chromosome 1. Même si ces auteurs présentent *AtALMT1* comme un transporteur d'acide organique, *AtALMT1* ne semble pas être un transporteur majeur puisque son atténuation ne conduit pas à une sécrétion nulle d'acide organique au niveau des racines en condition non stressante (**Figure 4.6**). Il y aurait donc d'autres transporteurs au malate chez *Arabidopsis* que le gène *AtALMT1*. Les auteurs proposent que la sécrétion induite de malate par le gène *AtALMT1* démontrée dans l'ovocyte de Xénope ne serait importante que lors d'exposition à l'aluminium. Il est difficile de penser que *AtALMT1* ou son homologue chez le blé *ALMT1* soient les gènes contrôlant la résistance à l'aluminium. Cependant, ces gènes sont importants dans la sécrétion de malate et leur surexpression permet de pallier le problème de toxicité au métal. Une hypothèse pourrait être que *AtALMT1* ou son homologue *ALMT1* permettent une sécrétion basale de malate influençant le taux de pénétration des ions métalliques dans la cellule. Leur atténuation telle qu'effectuée par **Hoekenga et al. (2006)** semble dramatique en présence d'aluminium mais pourrait s'expliquer par exemple par une pénétration beaucoup plus importante des ions métalliques et donc une plus forte mortalité cellulaire. D'autres transporteurs encore inconnus seraient alors responsables de la sécrétion de malate induite par le métal. Une autre hypothèse serait de présenter la famille des gènes *ALMT1* comme la famille des transporteurs au malate régulés lors d'exposition au métal et qu'il

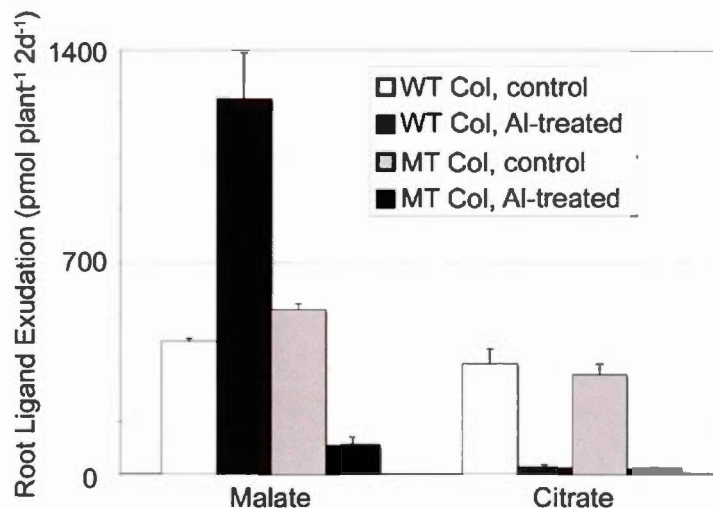
existerait d'autres mécanismes en amont de ces transporteurs contrôlant le taux de malate sécrété. En somme, d'après les nouveaux résultats de **Hoekenga *et al.* (2006)**, la sécrétion d'acide organique apparaît comme un mécanisme suffisant pour exprimer une tolérance à l'aluminium par les plantes mais cette tolérance se semble pas être contrôlée génétiquement par les gènes *AtALMT1* ou *ALMT1*.



**Figure 4.5 : Expression induite par l'aluminium du gène *AtALMT1* chez neuf variétés d'*Arabidopsis* et un mutant.**

Analyse par *northern blot* de l'expression du gène *AtALMT1* sur des racines stressées à l'aluminium. Le gène actine a été utilisé comme control des quantités d'ARN déposés. Neuf variétés d'*Arabidopsis* ont été utilisées pour leur différence de sensibilité au métal. Dans l'ordre décroissant de tolérance, ces variétés peuvent être classées en différents groupes : Niederzenez (Nd) et Kashmir (Kas) (très tolérantes) ; Columbia (Col) et Shakhara (Shah); Cape Verde Islands (Cvi), Nossen (No) et Wassilewskija (Ws); Bayreuth (Bay) et Landsberg *erecta* (Ler) (Sensibles). MT représente le mutant disrupté pour le gène *AtALMT1* chez la variété tolérante Columbia.

(d'après Hoekenga *et al.*, 2006)



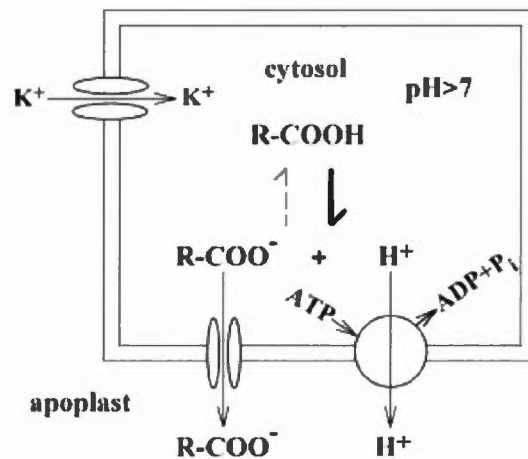
**Figure 4.6 : Sécrétion induite d'acides organiques au niveau de racines d'*Arabidopsis* en culture hydroponique.**

WT Col : variété sauvage tolérante Columbia. MT Col : mutant disrupté *AtALMT1* dérivé de la variété Columbia.  
(d'après Hoekenga *et al.*, 2006).

Il existerait deux gènes de tolérance chez le blé Atlas-66 (Camargo, 1981 ; Tang *et al.*, 2002). Le gène 49A1 pourrait donc constituer un gène de tolérance régulé par l'aluminium alors que *ALMT1* serait un gène constitutivement exprimé. Il pourrait être aussi un partenaire de *ALMT1* : *ALMT1* serait le transporteur de malate alors que 49A1 serait le régulateur d'*ALMT1* comme cela semble être le cas chez *Arabidopsis*. Le gène 49A1 pourrait aussi être un autre transporteur au malate comme démontré dans les travaux d'Hoekenga *et al.*, (2006). Ces deux gènes possèdent tous deux des hélices trans-membranaires les prédisposant à se situer au niveau de la membrane plasmique. Des études de co-transformation de 49A1 avec *ALMT1* chez des plantes sensibles seraient donc nécessaires pour confirmer le rôle peut-être en tandem de ces deux gènes dans le phénotype de tolérance chez le blé.

#### 4.1.4. MÉCANISMES HYPOTHÉTIQUES DE TRANSPORTS IMPLIQUÉS DANS LA TOLÉRANCE À L'ALUMINIUM

Des études chez le lupin blanc ont démontré que l'absorption du phosphate au niveau des racines impliquait une sécrétion d'acides organiques et la mise en jeu de pompes à protons. Les acides organiques sécrétés en cas de déficience en phosphate sont essentiellement l'acide citrique et malique (**Gardner *et al.*, 1983 ; Dinkelaker *et al.*, 1989 ; Li *et al.*, 1997 ; Keerthisinghe *et al.*, 1998 ; Neumann *et al.*, 1999**). Cette acidification par des molécules organiques serait essentielle pour dé-complexer les phosphates liés à l'aluminium, le fer ou la calcium (**Holford, 1997**). Cette sécrétion s'accompagne aussi d'un efflux de proton par l'ATPase membranaire car les molécules ne seraient disponibles dans le cytosol que sous forme de malate ou citrate due au pH neutre de la cellule (**Yan *et al.*, 2002 ; Figure 4.7**). Cet efflux de proton s'effectuerait en parallèle de la sécrétion d'acides organique (**Yan *et al.*, 2002**) même si ce parallélisme n'a jamais été prouvé.

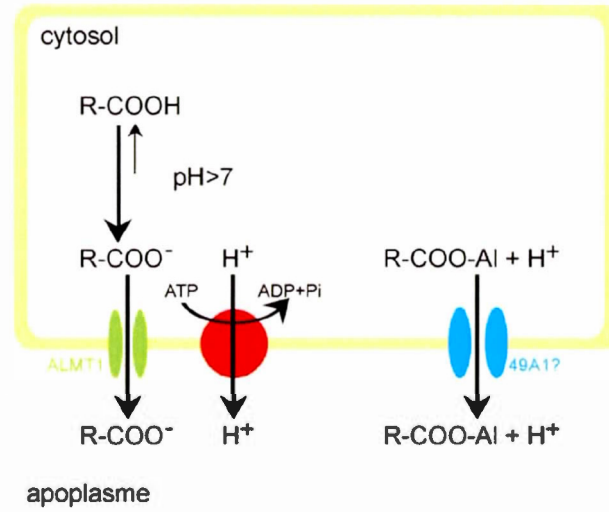


**Figure 4.7 : Mécanisme hypothétique de la sécrétion d'acides organiques par les cellules protéoides de lupin blanc.**  
(d'après Yan *et al.*, 2002).

Un mécanisme similaire vient d'être découvert pour l'aluminium. En effet, des chercheurs ont mis en évidence l'importance de l'ATPase à proton membranaire lors de la sécrétion de malate en réponse à la présence d'aluminium chez le blé (**Ahn et al., 2004**). Ils ont découvert que la sécrétion de malate s'accompagne d'une augmentation de la sécrétion de proton vers le milieu extérieur. Ils ont aussi montré que cette activité était inhibée par la présence d'aluminium chez la variété sensible ES8 mais pas chez la variété tolérante ET8 qui sécrète du malate pour résister à la présence du métal. Le même groupe de chercheur a aussi mis en évidence que l'augmentation d'activité de l'ATPase membranaire est liée à une régulation au niveau de la transcription et de la traduction du gène associé (**Shen et al., 2005**). Un schéma fonctionnel de la sécrétion d'acides organiques peut être envisagé par similitude aux mécanismes liés au phosphate (**Figure 4.8**, partie de gauche). Le gène *ALMT1* serait un transporteur d'acide organique, notamment au malate chez le blé, et la pompe à proton membranaire ATP dépendante contribuerait au contre-balancement des charges comme suggéré par **Yan et al. (2002)**. Des expériences de mutants sur-exprimant le gène de l'ATPase membranaire ont d'ailleurs permis de démontrer que l'augmentation d'activité d'ATPase membranaire suffisait à augmenter la sécrétion de citrate chez *Arabidopsis thaliana* (**Shen et al., 2004**) suggérant un rôle prioritaire de la pompe à proton sur le transporteur au citrate.

Pour le gène 49A1, une autre hypothèse pourrait être formulée. Des scientifiques ont mis en évidence des transporteurs de complexe citrate/aluminium au niveau de la barrière hémato-encéphalique (**Ackley et al., 1997**). Les complexes métalliques sont co-transportés avec des protons (**Ackley et al., 1998**). Ces échanges permettraient la détoxification du cerveau d'ions aluminium. Ils sont pilotés par un transporteur de monocarboxylate (MCT) sensible au pH (**Ackley et al., 1998**) et énergie dépendant (**Allen et al., 1995**). Un mécanisme similaire pourrait être proposé pour le gène 49A1 où un co-transport malate-aluminium et proton permettrait de détoxifier les cellules de racines de plantes (**Figure 4.8**). Il y aurait donc deux

systèmes : un constitutif impliquant le gène *ALMT1* et un autre induit impliquant le gène *49A1*. Les deux transporteurs pourraient travailler séparément ou en synergie.



**Figure 4.8 : Schéma hypothétique des transporteurs impliqués dans les mécanismes de tolérance à l'aluminium chez les plantes.**

#### 4.2. L'HYBRIDATION SUPPRESSIVE SOUSTRACTIVE (SSH)

Dans beaucoup de systèmes biologiques, des changements modestes de l'expression de certains gènes peuvent conduire à des changements significatifs de phénotype. Plusieurs approches sont couramment utilisées pour identifier des gènes différentiellement exprimés : l'ARNm *Differential Display* (DD), filtres ou puces à ADN, *Serial Analysis of Gene Expression* (SAGE), *Massively Parallel Signature Sequencing* (MPSS) et l'Hybridation Suppressive Soustractive (SSH) (Liang et Pardee, 1992 ; Schena *et al.*, 1995 ; Velculescu *et al.*, 1995 ; Brenner *et al.*, 2000 ; Diatchenko *et al.*, 1996). Ces techniques ont habituellement beaucoup de difficultés à isoler des gènes très faiblement exprimés d'intérêt pour différentes raisons : la



sélection au hasard de la DD, les limites de détection d'hybridation des filtres et puces à ADN, le nombre de clones et la génération de séquences très courtes (13 à 20 nucléotides) des SAGE et MPSS. La SSH est la seule technique qui tente d'enrichir une banque en ADNc d'intérêt. Cependant, le nombre de clones représentant des ADNc non-différentiellement exprimés (bruit de fond) peut considérablement excéder celui des clones ciblés dans les banques soustraites (**Rebrikov et al., 2000**).

Le niveau de bruit de fond rencontré dans les banques SSH est reconnu pour être dépendant de trois facteurs (**Diatchenko et al., 1998 ; Desai et al., 2000**) :

- (i) la qualité des ARN de départ
- (ii) le rendement de la soustraction
- (iii) et principalement du choix des populations de *tester* et *driver*

Les auteurs de la SSH soulignent que plus les populations de *driver* et *tester* sont très proches génétiquement, c'est-à-dire qu'il existe peu d'ARNm exprimés différemment entre elles, plus le bruit de fond sera élevé (**Desai et al., 2000**). Les auteurs de la SSH s'accordent aussi pour dire que la SSH normalise plus qu'elle ne soustrait (**Diatchenko et al., 1998**). Cette affirmation ne s'accorde pas avec l'idée de soustraction théorique de la technique et laisse en suspens un problème technique inhérent à la SSH. C'est pourquoi la SSH est souvent utilisée en combinaison avec d'autres techniques (**Kang et al., 1998 ; Yang et al. 1999 ; Hanazawa et al., 2001**). De nombreuses hypothèses ont été faites pour expliquer l'origine du bruit de fond durant la SSH et quelques modifications ont été proposées. Certains chercheurs suggèrent (i) une amplification non-spécifique des adaptateurs non-ligués et (ii) une hybridation non-effectuée des ADNc redondants entre les molécules de *driver* et *tester* (**Rebrikov et al., 2000**). D'autres auteurs proposent (iii) des digestions et des ligations d'ADNc *tester* non-effectuées qui se comporteraient alors comme des molécules de *driver* (**Kiss et al., 2003**). Cependant, les améliorations que ces deux équipes de chercheurs ont apportées basées sur leurs hypothèses respectives n'ont montré que de très faibles améliorations, notamment les procédés portant sur la



Sélection par l'Orientation Miroir (*Mirror Orientation Selection* ou MOS) (Rebrikov *et al.*, 2000).

Au cours de cette thèse, une autre hypothèse sur l'origine du bruit de fond a été établie. Il serait originaire de l'amplification indésirable de fragment *driver* ayant obtenu une séquence d'adaptateur au cours des premières étapes de SSH.

Dans le protocole standard de SSH décrit dans la **Figure 4.9**, les ARNm des deux populations à comparer sont avant tout rétro-transcrits en ADNc. Ces ADNc sont alors digérés par une enzyme de restriction à haute fréquence de coupure (*Rsa* I). La **Figure 4.9** décrit en haut la population d'ADNc *tester* digérés séparée en deux sous-population. Chaque sous-population est liguée à un adaptateur spécifique. Les ADNc digérés dit *driver* ne sont ligués à aucun adaptateur. Une première hybridation de chacun des deux sous-populations d'ADNc *tester* est effectuée avec un excès d'ADNc *driver* digérés. Différentes molécules double brin ou simple brin sont ainsi obtenues :

- (i) des molécules mono-brin d'ADNc *tester* n'ayant pas retrouvé de partenaire (molécule "a")
- (ii) des molécules *tester* ayant retrouvé un partenaire *tester* (molécule "b")
- (iii) des molécules *tester* ayant retrouvé un partenaire *driver* (molécule "c")
- (iv) et enfin des molécules de *driver* n'ayant pas trouvé de partenaire *tester* ou un partenaire *driver* (molécules "d")

Par la suite, ces deux sous-populations *tester/driver* sont mélangées et une deuxième hybridation est effectuée avec là encore un excès d'ADNc *driver*. Une nouvelle molécule appelée "e" peut alors apparaître. Elle est constituée par deux brins d'ADNc *tester* complémentaires ligués chacun à un type d'adaptateur différent. Après remplissage des extrémités par une ADN polymérase, les auteurs de la SSH affirment que seules les molécules de types "e" pourront être amplifiées de façon exponentielle par PCR. Les molécules possédant la même séquence en 5' et 3' d'adaptateur ne seront

pas amplifiées par la formation de structures en épingle à cheveux (molécules "b"). Les auteurs de la SSH affirment aussi que les molécules de type "c" ne seront amplifiées que de façon linéaire et les molécules de type "a" ne seront pas amplifiées du tout puisqu'elles ne possèdent pas de séquences complémentaires à celles des amorces (voir le protocole standard décrit par les auteurs de la SSH en section **CHAPITRE 2 : 2.5**).

L'hypothèse posée au cours de cette thèse serait que le bruit de fond lors de SSH serait essentiellement originaire des molécules de type "c" et dans une plus faible proportion des molécules de type "a" (**Figure 4.9**). Les molécules de type "c" acquièrent lors de l'étape de remplissage (*filling*) une séquence d'adaptateur (① et ②). Ces molécules peuvent alors être amplifiées de façon linéaire (③). De part leur grande abondance (le *driver* étant mis en excès), il est probable que ces molécules complémentaires nouvellement synthétisées (③) puissent se rencontrer et un remplissage intempestif par l'ADN polymérase peut alors se réaliser lors des étapes de PCR (④). Des molécules pouvant être amplifiées de façon exponentielle sont ainsi obtenues. De par leur provenance en excès du *driver*, la proportion de leur amplifiats dans les banques SSH standard devrait être importante.

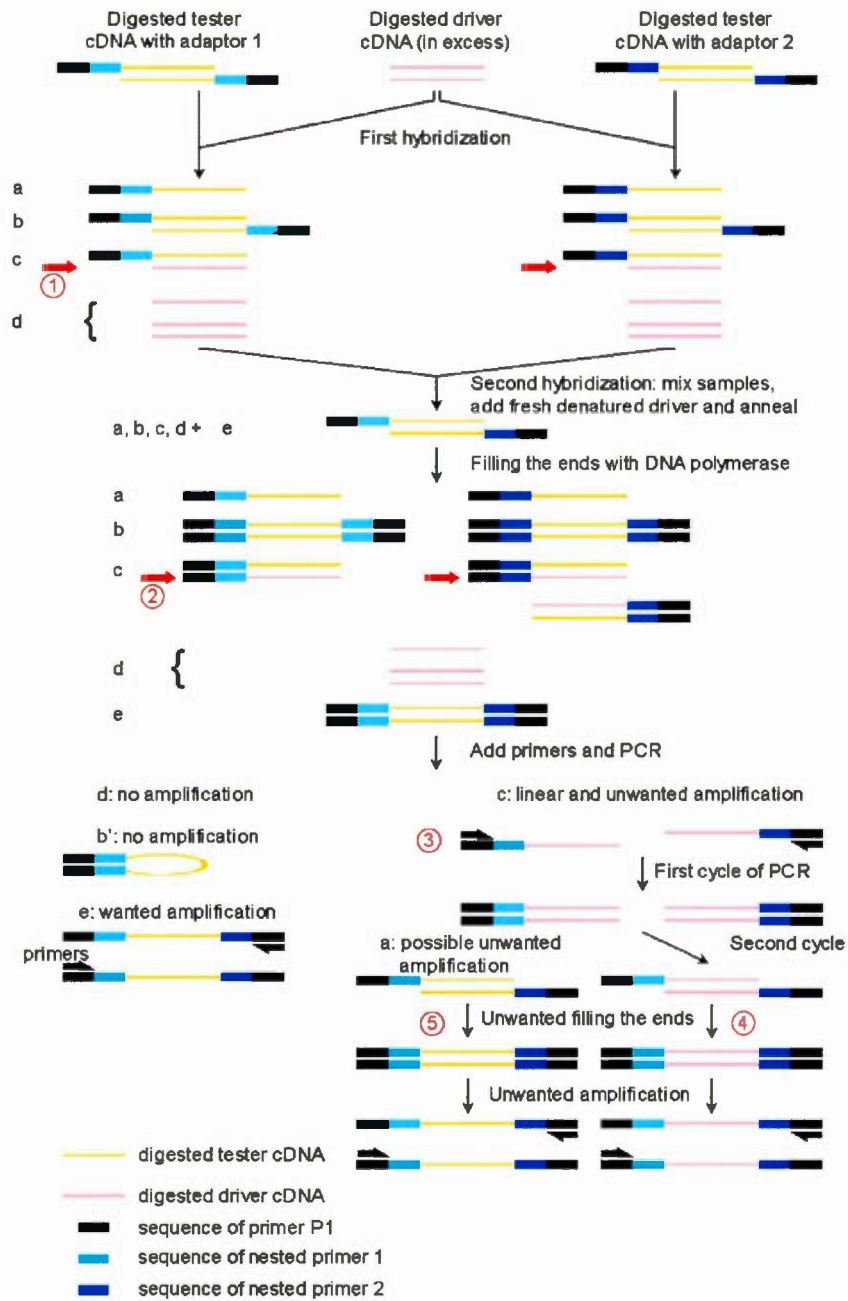


Figure 4.9 : Schéma du protocole standard de SSH avec les amplifications indésirables représentées.

Par rapport à cette hypothèse sur l'origine du bruit de fond dans les banques SSH, un nouveau procédé de Suppression PCR a été mis au point. Il s'agissait d'un procédé de Suppression PCR par Remplissage des Extrémités. Ce nouveau procédé repose sur trois points :

- (i) l'utilisation de *driver* non-digéré
- (ii) l'usage d'une ADN polymérase non-correctrice (sans activité exonucléase)
- (iii) la synthèse en 3' des brins digérés de *tester* d'une séquence complémentaire aux brins de *driver* non-digérés.

Lorsque ce nouveau procédé de Suppression PCR est appliqué à la SSH, l'amplification intempestive de molécule de type "c" ne peut se produire. En effet, l'utilisation de *driver* non-digéré et d'une ADN polymérase non-correctrice (sans activité exonucléase) ne permet pas la synthèse intempestive (① et ② **Figure 4.10**) d'une séquence d'adaptateur aux extrémités 3' lors de l'étape de remplissage (*filling*) comme observé dans le protocole SSH standard (① et ② **Figure 4.9**). De plus, ce nouveau procédé de Suppression PCR conduit à la synthèse en 3' des brins digérés de *tester* d'une séquence complémentaire aux brins de *driver* non-digérés (③ **Figure 4.10**). Ce nouveau brin d'ADN synthétisé (et l'usage d'une ADN polymérase non-correctrice pour ne pas le dégrader) étant complètement différent des séquences d'adaptateur, interdit ainsi l'amplification des molécules de type "c" (④ **Figure 4.10**)

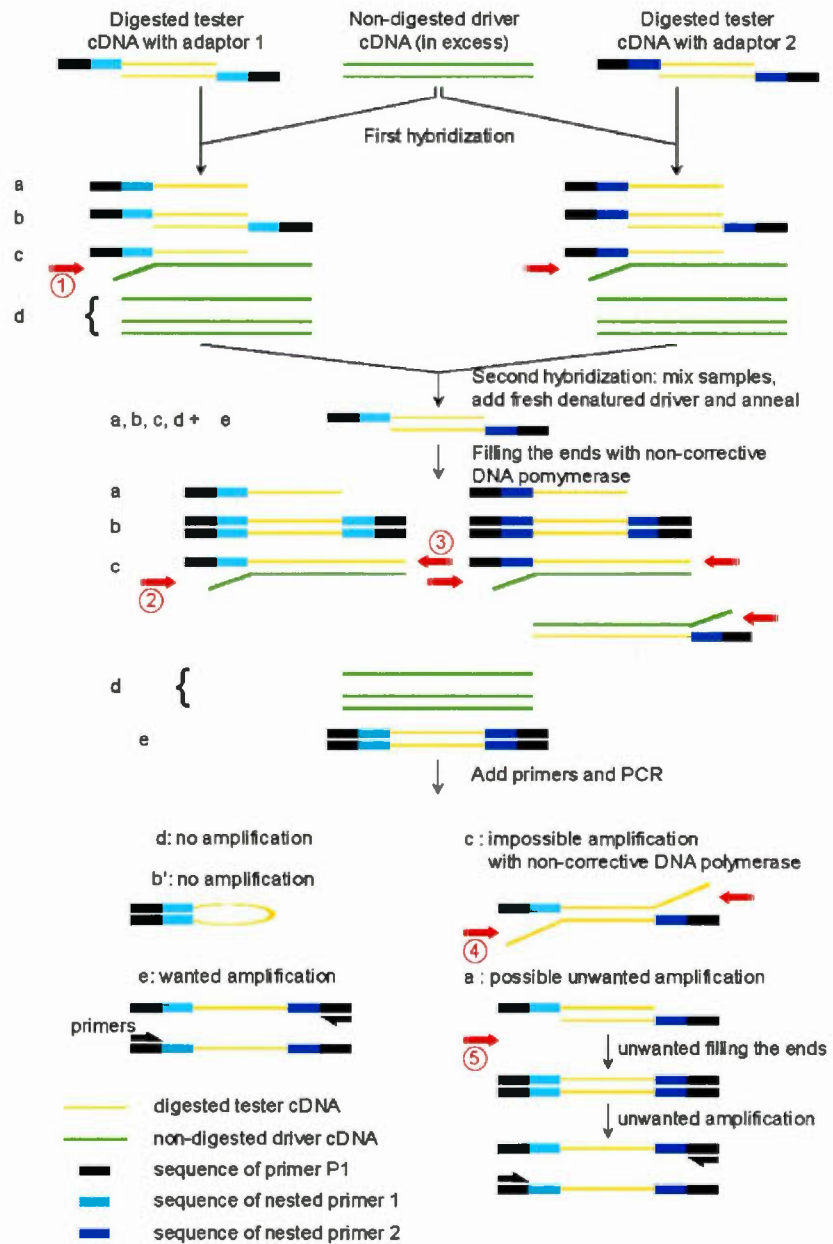
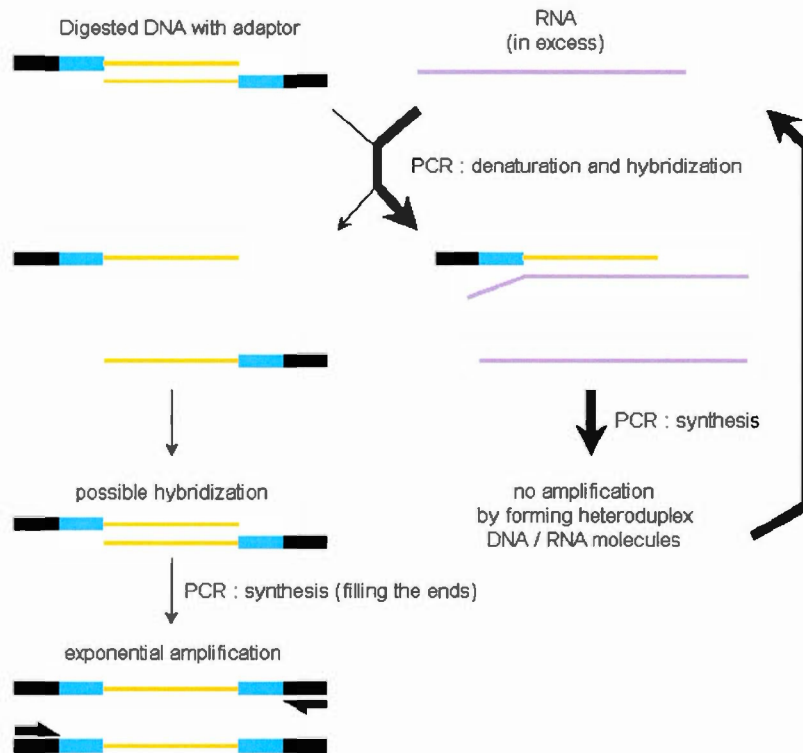


Figure 4.10 : Schéma du protocole modifié SSH.

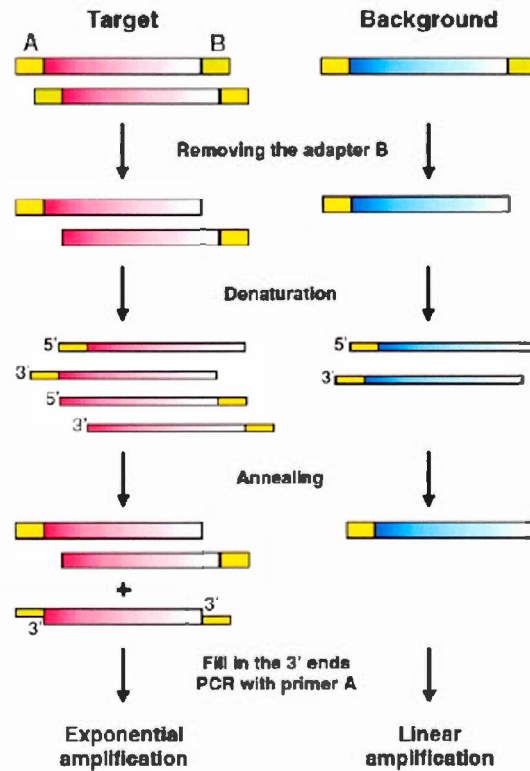
Reste le problème du bruit de fond dû aux molécules "a". Il résulte de l'hybridation de deux brins de *tester* n'ayant pas rencontré de brin complémentaire *driver*. Cette hybridation a une très faible probabilité de se réaliser car le *driver* est mis en large excès (⑤ **Figure 4.9**). Ainsi, l'amplification accidentelle des molécules de type "c" doit être la source majeure du bruit de fond alors que celle des molécules de type "a" ne devrait être quasiment inexistante.

Afin de prévenir tout de même le bruit de fond dû aux molécules de type "a", un procédé de Suppression PCR par ajout d'ARN a été appliqué (**Figure 4.11**). Ce nouveau procédé repose sur la compétition entre un fragment d'ARN et un fragment d'ADN pour un même brin d'ADN ciblé. Lors des cycles PCR de SSH, des hétéroduplexes ADN/ARN devraient se former. Ainsi, un ralentissement ou une inhibition de l'amplification des molécules de type "a" devraient être observés.



**Figure 4.11 : Schéma du procédé de suppression d'amplification par l'ajout d'ARN durant les réactions de PCR.**

Les ARN en formant des hétéroduplexes empêchent la réalisation des remplissages (*filling*) indésirables et la fixation des amorces.

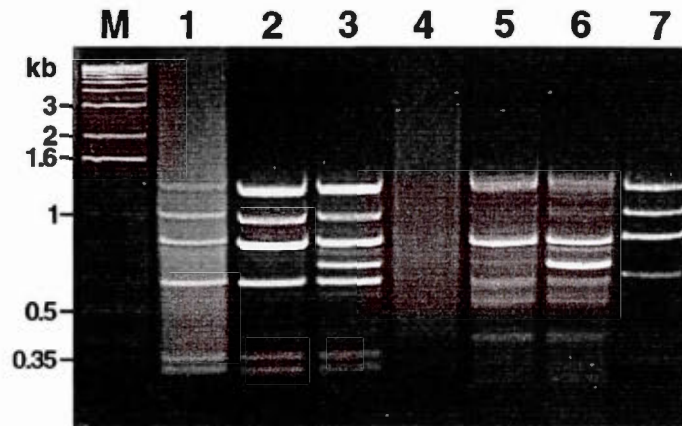


**Figure 4.12 : Schéma de la technique de Sélection par Orientation Miroir.**

Les rectangles étroits correspondent aux molécules d'ADNc simple-brin. Les rectangles larges correspondent aux molécules d'ADNc double-brin. Les ADNc *tester* d'intérêt sont représentés en roses. Les ADNc *tester* contaminants (selon l'hypothèse posée par les auteurs) sont représentés en bleus. Adaptateur 1 en jaunes et adaptateur 2 en vert. La molécule en haut à gauche représente une molécule de type "e" de SSH. (d'après Rebrikov *et al.*, 2000).



Rebrikov et collaborateurs ont posé comme hypothèse que le bruit de fond lors des procédés SSH pouvait être du à des hybridations non réalisées entre des molécules de *tester* et de *driver* (Rebrikov *et al.*, 2000). Ces molécules seraient amplifiées malgré la mise en excès de molécules d'ADNc *driver*. Selon cette hypothèse quant à l'origine du bruit de fond, les auteurs ont mis au point l'étape supplémentaire de Sélection par Orientation Miroir (Figure 4.12). Au cours de ces procédés supplémentaires, les molécules de *tester* d'intérêt sont séparées des molécules de *tester* ayant échappé aux hybridations avec un excès de *driver*. Une première étape consiste à supprimer un des adaptateurs (l'adaptateur 2 par exemple) par digestion enzymatique. Ensuite les molécules sont dénaturées puis ré-hybridées pour amplification. Les auteurs estiment que les molécules de *tester* conduisant au bruit de fond doivent être minoritaires. Ils estiment aussi que les molécules d'intérêt doivent être en plus grand nombre et donc statistiquement avoir plus de chance de présenter des molécules avec l'adaptateur 1 en 5' ou en 3'. Après remplissage des extrémités, ces molécules pourront être amplifiées puisqu'elles possèdent aussi bien en 3' qu'en 5' une séquence d'adaptateur ancrée (effet miroir par PCR nichée). La technologie MOS semble efficace pour des quantités importantes d'ADNc *tester* d'intérêt (0,01%) comparativement à la SSH standard (piste 2 comparativement à la piste 1 Figure 4.13 ; la piste 7 représente le profil idéal pouvant être obtenu).



**Figure 4.13 : Application de la technique MOS à la SSH.**

Gel d'électrophorèse des produits PCR. Piste M : marqueur de poids moléculaire (1 kb ladder, Gibco BRL) ; pistes 1 à 3 : ADNc *tester* ( $\phi$ X174 DNA) concentré à 0,01% ; pistes 4 à 6 : ADNc *tester* ( $\phi$ X174 DNA) concentré à 0,001% ; pistes 1 et 4 : seule la technique SSH a été utilisée ; piste 2 et 5 : les techniques SSH et MOS ont été combinées ; pistes 3 et 6 : les techniques SSH et MOS ont été combinées avec un large excès d'ADNc *driver* (ADN musculaire humain) ; piste 7 : contrôle positif constitué par l'ADNc *tester* ( $\phi$ X174 DNA) ligé aux adaptateurs. La procédure MOS permet d'enrichir les produits PCR en bandes d'intérêt (pistes 5 et 2 versus 4 et 1). Cependant, lorsque l'ADNc *tester* est faiblement présent, la qualité des produits obtenus est moyenne (piste 5). De plus, lorsque le *driver* est mis en excès (piste 6 et 3), des bandes supplémentaires sont alors présentes renforçant bien l'idée que les ADNc *driver* seraient à l'origine du bruit de fond des expériences SSH. (d'après Rebrikov *et al.*, 2000).

Cependant, l'analyse de leurs travaux permet aussi de constater que l'apparition de bandes majeures contaminantes est liée à la quantité d'ADN *driver* utilisée. En effet, plus la quantité de *driver* est grande, plus le bruit de fond est important. Ce bruit de fond est caractérisé par une augmentation de l'intensité de la traînée sur un gel d'agarose, l'apparition de bandes surnuméraires et la diminution de l'intensité des bandes d'intérêt (pistes 3 et 6 comparativement aux pistes 2 et 5 **Figure 4.13**). Cette observation confirme l'hypothèse faite dans cette thèse quant à l'origine du bruit de fond des procédés SSH : l'amplification accidentelle des molécules du

type "c" par l'utilisation d'ADN *driver* digéré. De plus, la technique MOS semble efficace si les fragments d'intérêt sont concentrés mais s'avère peu efficace si leur concentration est diminuée (piste 5 comparativement à la piste 2). Lorsque l'on compare les profils d'amplification SSH obtenus par cette équipe de chercheur avec ceux obtenus dans cette thèse, il semble que les nouveaux procédés de suppression exposés dans ce mémoire présentent des amplifiats PCR dépourvus de bandes intenses sur-numéraires pour un nombre de cycle très élevé signifiant un bruit de fond réduit et une capacité accrue de suppression (**Figure 4.13** et **Figure 3.15**). Ainsi les nouveaux procédés exposés dans cette thèse de Suppression PCR par ajout d'ARN et Remplissage des Extrémités apparaissent plus performants que les améliorations précédemment décrites dans la littérature, notamment la MOS. La SSH étant une technique très utilisée à travers le monde, ces améliorations techniques représentaient donc un intérêt scientifique mais aussi financier pour l'UQAM. Une déclaration de brevet a donc été rédigée pour être déposée auprès du bureau de valorisation de l'UQAM (Appendice B). Cependant, ces améliorations mériteraient d'être validées dans d'autres problématiques scientifiques et de nouvelles améliorations pourraient être testées comme par exemple l'addition de la technique de MOS en fin de SSH.

Les banques réalisées pour rechercher des gènes de tolérance à l'aluminium ont montré que le nombre de gènes différentiellement exprimés entre les blés tolérants Atlas-66 et les blés sensibles Fundy pour des états de stress similaires est très infime. Il semble donc que la majorité des gènes exprimés chez Atlas-66 sont aussi exprimés chez Fundy et à des taux similaires pour des niveaux de stress similaires. Ainsi, les blés qu'ils soient tolérants ou sensibles exprimeraient pour des états de stress identiques des gènes proches en séquences.

Lorsque l'on analyse les clones isolés dans les banques (**Appendice A.2** et **A.3**), de nombreux gènes présentaient une séquence connue. Cependant, cette collection de clones semble plus liée à un effet de bruit de fond résultant des limites

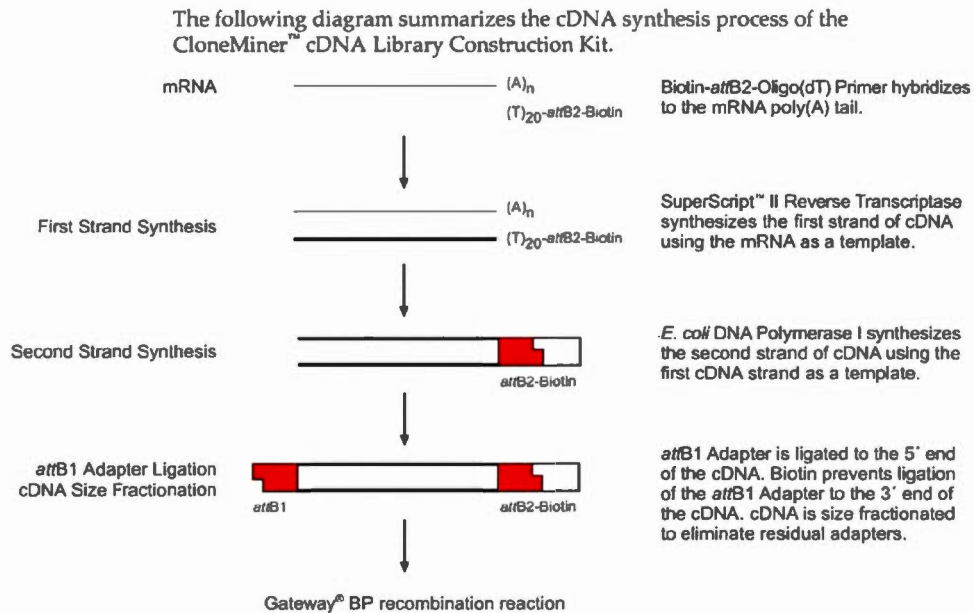
expérimentales de la SSH, les clones forts abondant comme par exemple les nombreux gènes du ribosome arrivant à détourner l'effet de soustraction de la SSH (**Tableau 3.3**). Cet effet de bruit de fond semble prouvé par la diminution des gènes constitutifs lors de l'utilisation des protocoles modifiés de SSH (**Tableau 3.4**). Cependant, plusieurs gènes dérégulés par l'aluminium ont pu être identifiés dans les banques SSH. Le gène 26H6 de l'Appendice A.3 par exemple code pour une phénylalanine ammonia-lyase, un gène sur-exprimé par l'aluminium (**Hamel *et al.*, 1998** ; gène *War 7.2* **Figure 3.3**). Un autre clone code pour une glutathion S-transférase identifié comme sur-exprimé par l'aluminium par les équipes de **Ezaki *et al.* (1995)** et **Richards *et al.* (1998)**. Un troisième clone semble coder pour le précurseur de la  $\beta$ -1,3-glucase, un autre gène sur-exprimé par le métal (**Cruz-Ortega *et al.*, 1997**). Cependant, l'analyse par *northern blot* d'autres clones sélectionnés pour leurs fonctions a démontré que tous les clones isolés n'étaient pas forcément des clones sur-exprimés par le métal (**Figure 3.13**). Il est donc certainement possible que de nombreux autres clones impliqués dans le stress de l'aluminium restent encore à être identifiés dans les collections des clones générés durant les banques SSH mais leur identification demanderait la réalisation à grande échelle de *northern blot* ou de PCR en temps réel. Une autre possibilité serait de mieux discriminer les clones sur-exprimés des clones faux positifs lors des étapes d'analyse *dot blot*. Le remplacement par exemple du marquage par la radioactivité par un marquage à la fluorescence des sondes pourrait peut-être permettre de re-classer les clones par niveau d'expression d'intérêt.

La technique SSH a été utilisée avec succès par les équipes ayant isolé le gène de tolérance *ALTMI* (**Sasaki *et al.*, 2004** ; **Delhaize *et al.*, 2004**) où des blés tolérants et sensibles étaient exposés à 50 $\mu$ M d'aluminium. De même, cette technique avec de nouveaux protocoles a permis d'isoler le gène 49A1. La technique SSH s'est révélée être la seule technique ayant permis d'isoler au moins un gène de tolérance validé par des études de transgénèse, ce qui confirme qu'elle constitue une technique de biologie

moléculaire de choix. La différence entre les travaux de Sasaki, Delhaize et collaborateurs et ceux relatés dans cette thèse repose sur le choix des populations d'ARNm de départ. Sasaki et collaborateurs ont choisi d'utiliser des blés isogéniques tolérants et sensibles exposés à 50 $\mu$ M d'aluminium. Les auteurs s'exposaient à trouver beaucoup de gènes de stress. D'ailleurs ils n'ont trouvé que très peu de gènes d'intérêt (Yamamoto, communication personnelle). Toutefois, le choix d'utiliser des blés isogéniques (issus d'un unique croisement entre un blé tolérant et un blé sensible) leur garantissait d'obtenir des hybridations d'ADNc sensible/tolérant favorisées. Les choix effectués dans cette thèse étaient de privilégier les gènes de tolérance en exposant les plantes sensibles et tolérantes à des états physiologiques similaires. Ce choix était aussi basé sur le fait que les précédentes études par criblages différentiels, banques d'EST et "ARNm *differential display*" avaient été faites pour une concentration fixe d'aluminium comme pour Sasaki, Delhaize et collaborateurs et que ces études n'avaient permis d'isoler que des gènes de stress et aucun gène de tolérance. Ces différences de protocoles peuvent peut-être expliquer pourquoi **Delhaize et al. (2004)** ont isolé un gène qui semble constitutivement actif (*ALTM1*) et qui n'est pas responsable des différences phénotypiques de tolérance alors que durant cette thèse le gène isolé (49A1) est sur-exprimé chez les variétés tolérantes par rapport aux variétés sensibles exposées à des états de stress similaires, ce qui en fait un gène dont l'expression est régulée par le métal

#### 4.3. LES BANQUES GATEWAY

Les problèmes rencontrés lors de la combinaison des techniques de PCR RACE et des systèmes de vecteurs navettes Gateway ont été causés par de trop fortes homologies entre les séquences AttB1 et AttB2. De même, il est maintenant reconnu que le système de clonage par Topoisomérase a un rendement trop faible pour être utilisé pour construire des banques de gènes.



**Figure 4.14 : Schéma du kit CloneMiner d'Invitrogen**

Fin septembre 2003, la compagnie Invitrogen a mis sur le marché son kit CloneMiner afin de construire des banques d'ADNc dans des vecteurs Gateway (Figure 4.14). La technique de clonage des ADNc est strictement similaire au procédé développé au cours de cette thèse : une première étape utilise un oligo(dT) possédant une biotine en 5' empêchant la fixation du deuxième adaptateur en 3' de l'ADNc mais uniquement en 5', une deuxième étape utilise les propriétés de recombinaison d'enzyme pour cloner dans un vecteur de propagation. Cependant, le procédé proposé dans cette thèse combine aussi un autre kit de la compagnie Invitrogen appelé GeneRacer qui permet d'amplifier les ADNc à partir de peu de quantité d'ARNm. Le procédé développé dans cette thèse présente donc un avantage certain pour des scientifiques désirant construire des banques d'ADNc Gateway à partir de très peu de matériel génétique.

Par rapport à la problématique sur l'aluminium, les améliorations apportées ont permis de construire deux banques qui, lorsqu'elles étaient exprimées dans la levure, montraient une meilleure croissance en présence d'aluminium par rapport au témoin. Malheureusement, les gènes responsables de cette résistance au métal n'ont pas été identifiés. Les séquences obtenues étaient très courtes et ne possédaient pas de séquence d'initiation de la traduction (Kozak). Une hypothèse raisonnable est de considérer que ces clones doivent être certainement des contaminants, possédant le vecteur pour survivre en milieu minimum mais qui profitent de la proximité et de la résistance à l'aluminium d'autres clones pour survivre en présence du métal. Le fait de retrouver la même séquence parmi les colonies analysées suggère que le clone isolé a des facilités à se multiplier. Ce genre de problème est souvent rencontré dans les cultures en milieux liquides où des clones à vecteurs "vides" se propageront plus rapidement que ceux possédant un vecteur permettant l'expression d'une protéine. Un moyen pour éviter ce genre de contaminants aurait été d'effectuer la sélection sur milieu solide par isolement. Cependant, plusieurs problèmes se posent lorsque la sélection se fait sur milieu solide : les milieux solides comportant de l'aluminium sont délicats à obtenir, les surfaces d'étalement devront être très grande, enfin l'évaluation de la viabilité nécessiterait un comptage systématique. Toutefois, cette approche pourrait très bien être de nouveau effectuée sur les banques initiales ou celles enrichies après plusieurs passages en milieu liquide afin d'isoler les clones résistants au métal.

#### 4.4. PERSPECTIVES

##### 4.4.1. LE GÈNE 49A1 : TOLÉRANCE ET PHYTOREMÉDIATION

Les travaux réalisés dans cette thèse n'ont permis d'isoler qu'un seul gène sur-exprimé spécifiquement d'un facteur deux à dix chez la variété de blé tolérant Atlas-66. Il coderait pour une protéine trans-membranaire et présente des caractéristiques physico-chimiques hypothétiques qui suggéreraient un rôle de transporteur. **Delhaize et collaborateurs (2004)** semblent avoir isolé un gène important dans la sécrétion et la tolérance à l'aluminium chez les céréales, le gène *ALTM1*. Cependant, ce gène ou ses homologues ne semblent pas être les gènes majeurs responsables de la tolérance mais plutôt des gènes impliqués dans les mécanismes constitutifs de sécrétion au malade des plantes. Chez Atlas-66, la tolérance est reconnue être portée par deux gènes majeurs (**Tang et al., 2002**). L'orthologue à *ALTM1* chez Atlas-66 constitue peut-être un de ces deux gènes. Le gène 49A1 pourrait constituer le deuxième partenaire.

A ce jour, peu d'informations sont disponibles dans la littérature pour pouvoir envisager le rôle réel du gène 49A1 et ses fonctions possibles. Cependant, suite à l'isolement de l'EST CD89431 qui contient une séquence Kozak suivie d'une séquence pouvant être traduite en une protéine de 121 acides aminés, il est maintenant possible de mener des expériences de transformations génétiques. De plus, il est aussi possible d'utiliser cette séquence d'EST pour amplifier la séquence complète de 49A1 à partir du blé tolérant Atlas-66.

Dans un premier temps, le rôle de 49A1 dans les mécanismes de tolérance serait validé par des expériences de surexpression chez l'orge par exemple, une céréale sensible. Les études de tolérance au métal devraient être validées en milieux artificiels mais aussi sur des sols naturellement acides. Si son rôle de gène de tolérance était validé chez les plantes, des expériences de fusion avec un gène rapporteur comme par exemple le gène de la GFP pourrait permettre de localiser la protéine 49A1 au niveau cellulaire. Dans un deuxième temps, la séquence promotrice



de 49A1 ou de l'EST CD89431 pourrait être recherchée et l'utilisation d'un gène rapporteur permettrait d'identifier les lieux d'expression de 49A1 au niveau de la plante entière. L'utilisation de gène rapporteur devrait aussi permettre de mieux comprendre la réponse induite par la présence du métal en étudiant par exemple la cinétique d'expression du gène par rapport aux concentrations d'aluminium dans les milieux. Des éléments de régulation, comme par exemple MYCCONSENSUSAT présent sur le promoteur du gène annoté de riz AE017085 (**Figure 3.34**), pourraient être recherchés afin de mieux comprendre comment 49A1 pourrait être régulé. Des transformations dans l'ovocyte de *Xenopus* pourraient permettre d'identifier la nature des molécules transportées. Enfin, des expériences de co-transformations avec les gènes *ALTM1* et/ou *ALS3* pourraient mettre en évidence des interactions fonctionnelles entre ces gènes lors de la réponse de résistance à l'aluminium.

Face au problème de phytotoxicité de l'aluminium dans les sols acides, de nouvelles variétés végétales pourraient être élaborées. En effet, grâce au gène *ALTM1* et *AtALTM1*, il semble maintenant possible de transférer le caractère de résistance au métal à de nombreuses variétés agronomiques. De nombreux sols impropres naturellement à l'agriculture à cause de leur acidité peuvent maintenant devenir des sols arables. Des stratégies de transfert de résistance pourraient être aussi envisagées avec le gène 49A1 si ce dernier est validé comme étant un gène majeur de la tolérance à l'aluminium. Pour les sols contaminés par l'activité humaine en ions aluminium, l'utilisation des transgéniques surexprimant *ALTM1* ne semble pas une bonne stratégie de phytoremédiation puisque ces mutants ne seraient pas des hyperaccumulateurs. Par contre, si 49A1 code pour un transporteur de complexe métal/polypeptide comme pour le cas de la tolérance au nickel où le métal est complexé à l'histidine puis transporté et stocké dans les vacuoles des appareils aériens, l'utilisation de mutants surexprimant 49A1 pourrait alors être un outil de phytoremédiation des sols contaminés par le métal aluminium.

#### 4.4.2. FAMILLE DE TRANSPORTEURS

Grâce aux séquences des gènes *ALMT1*, *ALS3* et celle de l'EST CD89431, de nouveaux transporteurs pourraient être recherchés à travers les génomes disponibles de plantes sensibles ou tolérantes. Des familles de gènes pourraient être ainsi identifiées par homologie de séquences et leurs rôles validés par des études de transgénèse comme cela a été démontré par les travaux de **Hoekenga *et al.*, (2006)**, pour les homologues à *ALMT1* chez *Arabidopsis*. De nouveaux gènes impliqués dans les mécanismes de réponse à l'aluminium pourraient être isolés de cette façon. Chaque nouveau transporteur identifié permettrait de mieux comprendre les mécanismes de flux de l'aluminium à travers les plantes.

#### 4.4.3. AUTRES GÈNES

Afin d'isoler d'autres gènes impliqués dans les mécanismes de toxicité à l'aluminium, l'analyse des clones isolés dans les banques SSH 4 et 5 devrait être poursuivie même si elle se heurte à la difficulté de réaliser de nombreux *northern blot* ou PCR en temps réel. En parallèle, les banques Gateway obtenues devront être criblées sur milieux solides. Toutefois, de nouvelles expérimentations pourraient être réalisées pour isoler des gènes d'ordre mineur de tolérance. Suivant les résultats exposés dans cette thèse et dans la littérature, deux technologies sont envisageables. La première est la SSH. En effet, c'est la seule technologie qui a permis à ce jour d'isoler un gène important pour la tolérance à l'aluminium (**Delhaize *et al.*, 2004**) et un gène spécifiquement surexprimé par l'aluminium chez un blé tolérant. Repartir sur cette technologie nécessiterait peut-être d'automatiser certaines parties notamment le re-piquage et la mise en culture des clones. De plus, dû aux difficultés de criblage lors de l'analyse de l'expression des gènes, de nouvelles conditions de marquages et de détection comme par exemple la fluorescence pourraient être utilisées afin d'obtenir des résultats plus quantitatifs. De même, des lignées isogéniques devraient être

privilégiées comme l'ont fait les équipes de Sasaki, Delhaize et collaborateurs afin de diminuer là encore le bruit de fond.

Enfin, une seconde technologie envisageable pourrait être les microarrays (puces à ADN ou *DNA chips*). Une puce contenant des oligo-nucléotides de 70 mères pourrait être hybridée avec les ADNc marqués de différentes conditions d'expositions à l'aluminium de plantes sensibles ou tolérantes. Un profil général d'expression dû au stress causé par le métal pourrait être ainsi obtenu. La difficulté pour identifier des gènes impliqués dans les processus de résistance serait leur représentativité dans les populations d'ARNm et la qualité des hybridations réalisées sur les puces à ADN. En effet, malgré les nouveaux progrès réalisés dans le domaine des puces à ADN, les variations d'expression des gènes faiblement exprimés sont encore difficiles à détecter.

#### 4.4.4. VALIDATION DES AMÉLIORATIONS TECHNIQUES

Différents résultats démontrent le gain de qualité apportée aux banques SSH par l'utilisation des nouveaux procédés de suppression présentés dans cette thèse : une diminution des clones abondants faux-positifs (**Figure 3.8**, **Figure 3.9**, **Figure 3.14** et **Figure 3.15**) et un enrichissement en clones d'intérêt (**Tableau 3.3**, **Tableau 3.4** et **Figure 3.16**). Cependant, afin de valider les améliorations apportées à la SSH, les différents protocoles modifiés devraient être appliqués à d'autres études de dérégulations génétiques. L'automatisation de la manipulation des clones serait aussi un grand avantage afin d'analyser un plus grand nombre de clones. Enfin, le marquage des ADN par des fluorochromes couplés à une détection laser (fluoroimager) permettrait une meilleure quantification des niveaux d'hybridation lors des expériences de *dot blot*. De la même manière, les protocoles de GeneRacer/Gateway pourraient être appliqués à de nouvelles problématiques afin de valider leur efficacité.

#### 4.5. CONCLUSION

Le problème des sols acides, impropres à l'agriculture classique, représente un enjeu économique très important face à l'augmentation de la population mondiale. Il est responsable de la limitation de la production agricole de l'ordre de 37,9% en Asie du sud, 30,9% en Amérique latine et approximativement 20% en Asie de l'est, Afrique sub-saharienne et l'Amérique du nord (**Wood *et al.*, 2000**). De plus, l'utilisation intensive des engrais a conduit à une forte acidification des sols comme par exemple aux Etats Unis (**Jackson et Reisenauer, 1984**). Le chaulage a été très longtemps utilisé pour remonter le pH de ces sols. Cependant, il représente une alternative fort coûteuse au problème de phytotoxicité de l'aluminium (toxique uniquement en milieu acide) notamment pour les fermiers des pays pauvres (**Rao *et al.*, 1993**). Une deuxième approche souvent abordée pour remédier à la toxicité du métal est une culture raisonnée des sols acides. Elle consiste en la culture de plantes très tolérantes à la présence du métal. Malheureusement, ces plantes représentent généralement un faible intérêt agronomique.

Depuis plus de 30 ans, les scientifiques tentent de comprendre les mécanismes conduisant à la tolérance de l'aluminium chez certaines plantes, mais ces mécanismes restent encore à l'heure actuelle assez obscurs.

Le but de cette thèse était de tenter d'isoler des gènes responsables de la tolérance à l'aluminium chez le blé Atlas-66 et le riz. Au cours des différentes démarches entreprises, des obstacles techniques sont rapidement apparus. Ils étaient essentiellement dus aux limites expérimentales des protocoles standards. Afin de surpasser ces limitations, des améliorations techniques ont été apportées : de nouveaux protocoles SSH plus performants ont été mis au point et des banques d'expression Gateway ont été réalisées à partir de faible quantité d'ARN poly A<sup>+</sup>.

Les améliorations techniques sur la SSH ont permis d'isoler un gène régulé différemment chez les blés tolérants : le gène 49A1. Ce gène est surexprimé d'un facteur deux à dix environ chez les blés tolérants comparativement aux blés sensibles

pour des états physiologiques similaires. De plus, l'expression chez la levure d'un homologue de 49A1 issu du blé Norstar confère une résistance modérée au métal, ce qui en fait un gène avec un fort potentiel. Ce gène semble un bon candidat pour être impliqué dans le transport du malate, un acide organique sécrété par les blés tolérants et considéré par la littérature comme étant une molécule de détoxification ou encore un transporteur d'un acide aminé ou d'un polypeptide de détoxification comme cela est le cas dans le cadre de la résistance au nickel avec l'acide aminé histidine (Krämer *et al.*, 1996). Le gène 49A1 code pour une protéine qui possède une forte homologie avec des transporteurs aux oligo-peptides proton dépendants. Elle posséderait trois hélices trans-membranaires. La position chromosomique de l'homologue de ce gène chez le riz semble apparemment particulière puisqu'il se situe à côté du gène de la  $\beta$  1-3 Glucanase, un gène de stress fortement induit par l'aluminium chez les plantes sensibles et tolérantes. Des expériences de transgénèse de l'EST CD89431 de blé codant pour 49A1 représentent dès lors un intérêt scientifique très important pour la compréhension des mécanismes de tolérance à l'aluminium.

Un gène important dans les mécanismes de tolérance à l'aluminium a été identifié par des équipes de chercheurs (Sasaki *et al.*, 2004 ; Delhaize *et al.*, 2004). Tout comme 49A1, ce gène *ALMT1* possède des hélices trans-membranaires. *ALMT1* permet la sécrétion de malate. Ainsi, il semblerait que la résistance à l'aluminium chez les plantes impliquerait essentiellement des transporteurs et ce, en nombre limité. Ces découvertes récentes permettent d'envisager le transfert du caractère de résistance au métal à un grand nombre de plantes à fort intérêt économique et de prévenir l'augmentation des besoins alimentaires de la population mondiale humaine en permettant l'agriculture sur les sols à faible pH. Enfin, ces gènes constituent aussi un moyen de réhabiliter des sols sujets aux pluies acides, à la déforestation ou à l'agriculture intensive. En effet, ces sols deviennent rapidement acides et seul un nombre limité de plantes peuvent par la suite reconquérir ces types de terrains. Grâce

au génie génétique, il serait possible de ré-habiller ces sols par le biais de variétés génétiquement modifiées.

**APPENDICE A**  
**RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES**

|                                                                                                   |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Appendice A.1 : Séquences nucléiques partielles des inserts des clones 49A1, 49G9<br>et 45C2..... | 186 |
| Appendice A.2 : Analyse de séquence de 289 clones de la banque 4.....                             | 187 |
| Appendice A.3 : Analyse de séquence de 72 clones de la banque 5.....                              | 201 |

**Appendice A.1 : Séquences nucléiques partielles des inserts des clones 49A1, 49G9 et 45C2.**

49A1 GTTCACCAGCATCGGCATGCTCGAGTTCTTCTACGACCAGCCCCGGAGTCCATGAAGAGCC  
TGGGTGTGGCACTCGCGCAGCTCGCCGTTGCTGGCGGGAACCTCAACTCCGCCCTGCTC  
GGCGCCGTTGTGTCGGCCACGGGGTGGATCCCGGACAACCTCGACGAAGGCCATCTGAACTA  
CTTCTTCTGGTTCATGGCGGCTCTGAGCGTCTCAACCTGCTGCAGTTCGCTACTGCTCGT  
CCAGATACAAAAGATAATGATCGATATTTTCGTAACCTATAGATGTATAGTTTGT

49G9 GCTCTCTCGTCCCAGTCCTCTGGCTTCTTGTCTGTCAGGGTCAGGAATACTCTTTGATGGAAT  
AAGTGCCGGCTCAAATCAGCAGCAGACAGGAAGTTTGCTTTACTCTTCTCCACCCCATCAA  
CCAAAATTCTGACCTCATTATCCGGCTTCAAGATAGCCGTGTAGACATGAGAGAGCTTGTC  
TATGGGACAGAGGGTGGGACTTGAGGTGATGTTCAACGTATTTGCCAGTCTTAGGGTTCTT  
GTGCTTCAGGATGAAGTGAACCTTGTTTCGTTGAACCACACTTGTCTGGGACCAAACATAATTG  
TGTATGGAGTATCATTGTCAA

45C2 ACAACTTCAGCGGGACGAACCAGCCTGACCCGACCCTCGACGCGACATACCGAGCCTTCCTG  
TCACAGAGATGCCCGAGGAACGGCGACGGAACGTCCCTCAACG



**Appendice A.2 : Analyse de séquence de 289 clones de la banque 4.**

L'analyse des séquences a été faite à l'aide du script BLAST de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

Par la suite, les séquences identiques ont été isolées par le script de CAP Assembly (<http://bio.ifom-firc.it/ASSEMBLY/assemble.html>). Dans ces tableaux, la première ligne correspond à la plus forte homologie de séquence obtenue, la deuxième ligne correspond à une homologie assez forte avec un gène de fonction connue. Dans ce cas, la troisième ligne mentionne la fonction hypothétique du gène dont serait issu l'insert SSH. Une synthèse et un classement du nombre de clone par catégories fonctionnelles ont ensuite été effectués et sont décrits dans le **Tableau 3.3**. De ces tableaux, une représentation graphique a été réalisée et constitue la **Figure 3.17, partie A**.

| Clones | CAP assembly                     | NCBI BLAST Best e-value<br>NCBI BLAST first know gene (e<1)                                                                                                                                                                                                                  |
|--------|----------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 5A03+  | 5E11+ 8D09+ 7D11+                | <a href="#">gil37991137 dbj AK121514.1</a> Oryza sativa (japonica cultivar... <a href="#">537</a> e-150<br>Unknown                                                                                                                                                           |
| 5A08+  | 8B11+ 5B08+ 5C11+                | <a href="#">gil37991797 dbj AK122151.1</a> Oryza sativa (japonica cultivar... <a href="#">105</a> 4e-20<br>Unknown                                                                                                                                                           |
| 5A12+  | 6F11+ 8A11-                      | <a href="#">gil37989808 dbj AK120185.1</a> Oryza sativa (japonica cultivar... <a href="#">502</a> e-139<br><a href="#">gil11995456 gb AF323586.1 AF323586</a> Oryza sativa aldehyde de... <a href="#">502</a> e-139<br>Oryza sativa aldehyde dehydrogenase                   |
| 5B03+  | 8D06- 8G05+                      | <a href="#">gil31433414 gb AE017118.1</a> Oryza sativa (japonica cultivar... <a href="#">52</a> 3e-04<br>Unknown                                                                                                                                                             |
| 5B05+  | 5B06+ 5C08+ 6F03+<br>8A05- 5C02+ | <a href="#">gil32400864 gb AF479045.1</a> Triticum aestivum S28 ribosomal ... <a href="#">321</a> 3e-85<br><a href="#">gil32400864 gb AF479045.1</a> Triticum aestivum S28 ribosomal ... <a href="#">321</a> 3e-85<br>Triticum aestivum S28 ribosomal protein                |
| 5C05+  | 7B05+ 7C07+                      | <a href="#">gil37989656 dbj AK120033.1</a> Oryza sativa (japonica cultivar... <a href="#">206</a> 2e-50<br><a href="#">gil488055 gb U06108.1 ZMU06108</a> Zea mays B73 QM protein <a href="#">159</a> 5e-36<br>Unknown / Zea mays B73 QM protein                             |
| 5D02-  | 6A10+                            | <a href="#">gil32128745 gb BT009194.1</a> Triticum aestivum clone wile1.pk0... <a href="#">389</a> e-105<br>Unknown                                                                                                                                                          |
| 5D03+  | 5H09- 7D01+ 8A02-                | <a href="#">gil32983288 dbj AK073265.1</a> Oryza sativa (japonica cultivar... <a href="#">351</a> 5e-94<br>Unknown                                                                                                                                                           |
| 5D04-  | 7A11+ 7C11+ 7C01+<br>7F06-       | <a href="#">gil32128560 gb BT009009.1</a> Triticum aestivum clone wdk3c.pk... <a href="#">819</a> 0.0<br><a href="#">gil34909737 ref NM_191327.1</a> Oryza sativa (japonica cultivar... <a href="#">567</a> e-159<br>Oryza sativa Aspartate aminotransferase                 |
| 5D05+  | 5F06+ 8D03+                      | <a href="#">gil29647483 dbj AP003888.3</a> Oryza sativa (japonica cultivar ... <a href="#">62</a> 7e-07<br>Unknown                                                                                                                                                           |
| 5D06+  | 5H04+                            | <a href="#">gil32981915 dbj AK071892.1</a> Oryza sativa (japonica cultivar... <a href="#">307</a> 5e-81<br><a href="#">gil30689722 ref NM_122419.2</a> Arabidopsis thaliana endomembr... <a href="#">168</a> 3e-39<br>Unknown / Arabidopsis thaliana endomembrane protein 70 |
| 5D08-  | 6H09+ 6E09+ 8C09+<br>7B08+ 7H03+ | <a href="#">gil32970441 dbj AK060423.1</a> Oryza sativa (japonica cultivar... <a href="#">103</a> 2e-19<br>Unknown                                                                                                                                                           |
| 5D11-  | 8H08+                            | <a href="#">gil32972357 dbj AK062339.1</a> Oryza sativa (japonica cultivar ... <a href="#">117</a> 1e-23<br>Unknown                                                                                                                                                          |
| 5E03+  | 7E10+ 7F03- 8B12+<br>6D04+ 8H10- | <a href="#">gil32977225 dbj AK067207.1</a> Oryza sativa (japonica cultivar ... <a href="#">309</a> 2e-81<br>Unknown                                                                                                                                                          |
| 5E04+  | 6G08+ 6F05+                      | <a href="#">gil24211088 gb AC107226.2</a> Oryza sativa (japonica cultivar... <a href="#">430</a> e-117<br><a href="#">gil34902277 ref NM_187596.1</a> Oryza sativa (japonica cultivar... <a href="#">420</a> e-114<br>Oryza sativa Putative response regulator               |
| 5E10-  | 8D04+                            | <a href="#">gil32979691 dbj AK069667.1</a> Oryza sativa (japonica cultivar ... <a href="#">182</a> 2e-43<br>Unknown                                                                                                                                                          |

|                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |  |
|-------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
| 5E12+             | Unknown                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |  |
| 6A04+ 5H02+ 6B09+ | gii32400860[gb]AF479043.1 Triticum aestivum 40S ribosomal ... <a href="#">74</a> <a href="#">7e-11</a><br>gii32400860[gb]AF479043.1 Triticum aestivum 40S ribosomal ... <a href="#">74</a> <a href="#">7e-11</a><br>Triticum aestivum 40S ribosomal protein                                                                                  |  |
| 5F03+             | gii32975103[dbj]AK065085.1 Oryza sativa (japonica cultivar ... <a href="#">107</a> <a href="#">1e-20</a><br>Unknown                                                                                                                                                                                                                          |  |
| 5F07+             | gii2326758[emb]Y14433.1 MITANAD2 Triticum aestivum mitochondon... <a href="#">862</a> <a href="#">0.0</a><br>gii2326758[emb]Y14433.1 MITANAD2 Triticum aestivum mitochondon... <a href="#">862</a> <a href="#">0.0</a><br>Triticum aestivum mitochondrial nad2 NADH dehydrogenase                                                            |  |
| 5F10+             | gii30699039[ref]NM_106130.2  Arabidopsis thaliana C2 domain... <a href="#">44</a> <a href="#">0.13</a><br>Unknown                                                                                                                                                                                                                            |  |
| 5F12+             | gii37536103[ref]NM_197372.1 Oryza sativa (japonica cultivar... <a href="#">86</a> <a href="#">5e-14</a><br>gii37536103[ref]NM_197372.1 Oryza sativa (japonica cultivar... <a href="#">86</a> <a href="#">5e-14</a><br>Unknown / putative cytochrome                                                                                          |  |
| 5G10+             | gii22831291[dbj]AF005244.3  Oryza sativa (japonica cultivar... <a href="#">90</a> <a href="#">6e-15</a><br>gii11141552[gb]AF277239.1 AF277239 Heteranthelium piliferum... <a href="#">70</a> <a href="#">5e-09</a><br>Unknown                                                                                                                |  |
| 5G12+             | gii37548543[gb]AY135021.1 Triticum aestivum GTP-binding pr... <a href="#">274</a> <a href="#">4e-71</a><br>gii37548543[gb]AY135021.1 Triticum aestivum GTP-binding pr... <a href="#">274</a> <a href="#">4e-71</a><br>Triticum aestivum GTP-binding protein                                                                                  |  |
| 5H07-             | gii4325044[gb]AF117660.1 AF117660 Triticum aestivum S-aden... <a href="#">341</a> <a href="#">4e-91</a><br>gii4325044[gb]AF117660.1 AF117660 Triticum aestivum S-aden... <a href="#">341</a> <a href="#">4e-91</a>                                                                                                                           |  |
| 5H08+             | Triticum aestivum S-adenosylmethionine decarboxylase precursor<br>gii32128789[gb]BT009238.1 Triticum aestivum clone wtk1.pk0... <a href="#">430</a> <a href="#">e-118</a><br>gii34901883[ref]NM_187399.1 Oryza sativa (japonica cultivar... <a href="#">147</a> <a href="#">1e-32</a><br>Unknown / Oryza sativa putative RNA Binding Protein |  |
| 5H10+             | gii13276126[emb]AL163612.5 CNS01R   Human chromosome 14 <a href="#">46</a> <a href="#">0.032</a><br>Unknown                                                                                                                                                                                                                                  |  |
| 5H11-             | gii21070378[gb]AF508970.1 Triticum aestivum translationall... <a href="#">876</a> <a href="#">0.0</a><br>gii21070378[gb]AF508970.1 Triticum aestivum translationall... <a href="#">876</a> <a href="#">0.0</a><br>Triticum aestivum translationally controlled tumor protein                                                                 |  |
| 5H12+             | gii21212427[gb]AY109046.1 Zea mays PCO118266 mRNA sequenc <a href="#">48</a> <a href="#">0.008</a><br>gii25006388[dbj]AE096068.1 Arthroderma gypseum top2 gene f... <a href="#">48</a> <a href="#">0.008</a><br>Unknown                                                                                                                      |  |
| 6A03-             | gii37990308[dbj]AK120685.1 Oryza sativa (japonica cultivar... <a href="#">194</a> <a href="#">4e-47</a><br>Unknown                                                                                                                                                                                                                           |  |
| 6A08+             | gii32128825[gb]BT009274.1 Triticum aestivum clone wtk8.pk0... <a href="#">926</a> <a href="#">0.0</a><br>gii1737491[gb]U81318.1 TAU81318 Triticum aestivum poly(A)-b... <a href="#">161</a> <a href="#">2e-36</a><br>Triticum aestivum poly(A)-binding protein                                                                               |  |
| 6A09+             | gii9944150[emb]AL161941.18  Human DNA sequence from clone R <a href="#">42</a> <a href="#">0.26</a>                                                                                                                                                                                                                                          |  |

|       |                            |                                                                                                                                                                                                                                                 |
|-------|----------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 6C04- | 6F08+ 5C01+                | Unknown<br>gi 32983297 dbj AK073274.1  Oryza sativa (japonica cultivar... 317 7e-84<br>gi 26984412 emb AJ534349.1 ABI534349 Agaricus bisporus part... 44 0.16                                                                                   |
| 6C11- | 6D06+ 8G08+ 8B05-<br>6E07+ | Unknown<br>gi 34908139 ref NM_190528.1  Oryza sativa (japonica cultivar... 258 4e-66<br>gi 34908139 ref NM_190528.1  Oryza sativa (japonica cultivar... 258 4e-66<br>Oryza sativa (japonica cultivar-group) putative HSP70                      |
| 6C12+ | 8C11+                      | gi 7211788 gb AF234528.1 AF234528 Avena nuda actin 1 gene, ... 240 5e-61<br>gi 7211788 gb AF234528.1 AF234528 Avena nuda actin 1 gene, ... 240 5e-61<br>Avena nuda actin                                                                        |
| 6D05+ | 6D10+ 8E05-                | gi 32979831 dbj AK069807.1  Oryza sativa (japonica cultivar... 202 3e-49<br>Unknown                                                                                                                                                             |
| 6E02+ | 8H09+ 7B01- 7H12+<br>7H05+ | gi 37536539 ref NM_197590.1  Oryza sativa (japonica cultivar... 442 e-121<br>gi 37536539 ref NM_197590.1  Oryza sativa (japonica cultivar... 442 e-121<br>Oryza sativa Putative ubiquitin protein                                               |
| 6E04+ | 7C05+                      | gi 5123909 emb X98582.1 ITAX98582 T.aestivum mRNA for HSP80 387 e-105<br>gi 5123909 emb X98582.1 ITAX98582 T.aestivum mRNA for HSP80 387 e-105<br>Triticum aestivum mRNA for HSP80-2 protein                                                    |
| 6E10+ | 7D06+ 7B07+ 7A01+          | gi 32977342 dbj AK067324.1  Oryza sativa (japonica cultivar... 52 6e-04<br>Unknown                                                                                                                                                              |
| 6G05+ | 7F01+                      | Unknown                                                                                                                                                                                                                                         |
| 6G07- | 6D08+ 7C06+                | gi 38174806 emb AJ495769.1 HVU495769 Hordeum vulgare mRNA 210 5e-52<br>gi 38174806 emb AJ495769.1 HVU495769 Hordeum vulgare mRNA 210 5e-52<br>Hordeum vulgare putative immunophilin                                                             |
| 6G12+ | 8E09+                      | gi 32979950 dbj AK069926.1  Oryza sativa (japonica cultivar... 864 0.0<br>gi 34901883 ref NM_187399.1  Oryza sativa (japonica cultivar... 54 4e-04<br>Unknown / Oryza sativa putative RNA Binding Protein                                       |
| 6H05+ | 6H06+                      | gi 32406171 ref XM_323698.1  Neurospora crassa strain OR74A 42 1.4<br>Unknown                                                                                                                                                                   |
| 7A05+ | 7B02+ 7E03+ 8G10+          | gi 34911375 ref NM_192146.1  Oryza sativa (japonica cultivar... 121 2e-25<br>gi 34911375 ref NM_192146.1  Oryza sativa (japonica cultivar... 121 2e-25<br>Unknown / Oryza sativa (japonica cultivar-group) putative Ser/Thr protein phosphatase |
| 7A06+ | 7A07+                      | gi 32400807 gb AF475114.1  Triticum aestivum 60s ribosomal ... 391 e-106<br>gi 32400807 gb AF475114.1  Triticum aestivum 60s ribosomal ... 391 e-106<br>Triticum aestivum 60s ribosomal protein L21                                             |
| 7C02- | 8A04+                      | gi 14317905 dbj AB052133.1  Triticum aestivum tck2a mRNA fo... 287 7e-75<br>gi 14317905 dbj AB052133.1  Triticum aestivum tck2a mRNA fo... 287 7e-75<br>Triticum aestivum tck2a mRNA for casein kinase II alpha                                 |
|       |                            | gi 1668772 emb X99608.1 OSSMT3 O.sativa mRNA for SMT3 prot 272 4e-70<br>gi 1668772 emb X99608.1 OSSMT3 O.sativa mRNA for SMT3 prot 272 4e-70                                                                                                    |



|             |  |                                                                                                                                                                                                                              |
|-------------|--|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 7E05+       |  | Oryza sativa SMT3 protein<br>gi 23683229 gb AC095021.2  Sus scrofa clone RP44-290D23, co... <a href="#">40</a> 2.2                                                                                                           |
| 8C04+       |  | Unknown                                                                                                                                                                                                                      |
| 7E12+       |  | gi 170772 gb L11872.1 WHTSHH Triticum aestivum S-adenosyl-L... <a href="#">989</a> 0.0<br>gi 170772 gb L11872.1 WHTSHH Triticum aestivum S-adenosyl-L... <a href="#">989</a> 0.0                                             |
| 7F05+       |  | Triticum aestivum S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase (SH6.2)<br>gi 32129039 gb BT009488.1  Triticum aestivum clone wr1.pk00... <a href="#">40</a> 1.4                                                                       |
| 7H06+       |  | Unknown                                                                                                                                                                                                                      |
| 7H07+       |  | gi 17298146 db AB070254.1  Oryza sativa (japonica cultivar... <a href="#">159</a> 2e-36<br>gi 17298146 db AB070254.1  Oryza sativa (japonica cultivar... <a href="#">159</a> 2e-36                                           |
| 8A03+       |  | Unknown / Oryza sativa 26S proteasome regulatory particle triple-A ATPase<br>gi 30522954 gb AY233387.1  Influenza A virus (A/duck/NC/913... <a href="#">42</a> 0.76                                                          |
| 8A08+       |  | Unknown                                                                                                                                                                                                                      |
| 8H11+       |  | gi 33930656 emb AJ001117.1 TASUCSYN1 Triticum aestivum mRNA <a href="#">511</a> e-142<br>gi 33930656 emb AJ001117.1 TASUCSYN1 Triticum aestivum mRNA <a href="#">511</a> e-142                                               |
| 8C02-       |  | Triticum aestivum mRNA for sucrose synthase type I                                                                                                                                                                           |
| 5E07+ 8F02+ |  | gi 960356 db D63835.1 BLYSAS Barley mRNA for S-adenosylmet... <a href="#">523</a> e-146<br>gi 960356 db D63835.1 BLYSAS Barley mRNA for S-adenosylmet... <a href="#">523</a> e-146                                           |
| 8E02-       |  | Barley S-adenosylmethionine synthetase<br>gi 32993579 db AK108370.1  Oryza sativa (japonica cultivar... <a href="#">359</a> 3e-98<br>gi 6860126 ref NM_008187.1  Mus musculus gene trap locus 3 ... <a href="#">90</a> 5e-15 |
| 8E11+       |  | Unknown                                                                                                                                                                                                                      |
| 8E12+       |  | gi 31581006 db AF006375.1  Lotus corniculatus var. japonic... <a href="#">44</a> 0.19                                                                                                                                        |
| 8H02+       |  | Unknown                                                                                                                                                                                                                      |
| 8H03+       |  | gi 32975346 db AK065328.1  Oryza sativa (japonica cultivar... <a href="#">58</a> 1e-06<br>gi 18419828 ref NM_119803.1  Arabidopsis thaliana D-lactate ... <a href="#">50</a> 3e-04                                           |
| 5A01        |  | Unknown                                                                                                                                                                                                                      |
| 5A02        |  | gi 34536760 gb AC115910.6  Mus musculus, clone RP24-480017... <a href="#">42</a> 0.40                                                                                                                                        |
| 5A04        |  | Unknown                                                                                                                                                                                                                      |
| 5A05        |  | gi 37991115 db AK121492.1  Oryza sativa (japonica cultivar... <a href="#">82</a> 7e-13                                                                                                                                       |
| 5A06        |  | Unknown                                                                                                                                                                                                                      |
| 5A07        |  | gi 32992346 db AK107137.1  Oryza sativa (japonica cultivar... <a href="#">167</a> 2e-38                                                                                                                                      |
| 5A09        |  | Unknown                                                                                                                                                                                                                      |
| 5A09        |  | gi 21209457 gb AY106379.1  Zea mays PCO085820 mRNA <a href="#">52</a> 6e-04                                                                                                                                                  |
| 5A06        |  | Unknown                                                                                                                                                                                                                      |
| 5A07        |  | gi 28412559 emb AL772306.10  Mouse DNA sequence from clone <a href="#">48</a> 0.008                                                                                                                                          |
| 5A09        |  | gi 21209405 gb AY106327.1  Zea mays PCO142080 mRNA <a href="#">46</a> 0.043                                                                                                                                                  |
|             |  | Unknown                                                                                                                                                                                                                      |

|      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 5A10 | <a href="#">gi 32986524 dbj AK101315.1 </a> <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar... <a href="#">406</a> e-110<br><a href="#">gi 18421797 ref NM_123243.1 </a> <i>Arabidopsis thaliana</i> amino aci... <a href="#">62</a> 1e-06<br>Unknown                                                                         |
| 5A11 | <a href="#">gi 21553249 gb AC116991.2 </a> <i>Homo sapiens</i> chromosome 3 clone ... <a href="#">40</a> 1.2<br>Unknown                                                                                                                                                                                              |
| 5B01 | <a href="#">gi 28272307 emb AL935261.1 </a> <i>Lactobacillus plantarum</i> strain ... <a href="#">38</a><br>Unknown                                                                                                                                                                                                  |
| 5B02 | <a href="#">gi 22606 emb X62388.1 HV1433PH</a> <i>H. vulgare</i> mRNA for 14-3-3 p... <a href="#">720</a> 0.0<br><a href="#">gi 22606 emb X62388.1 HV1433PH</a> <i>H. vulgare</i> mRNA for 14-3-3 p... <a href="#">720</a> 0.0<br><i>Hordeum vulgare</i> protein kinase regulator (14-3-3 protein homologue)         |
| 5B04 | <a href="#">gi 32984669 dbj AK099460.1 </a> <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar... <a href="#">500</a> e-138<br><a href="#">gi 30680379 ref NM_127401.2 </a> <i>Arabidopsis thaliana</i> succinate... <a href="#">283</a> 1e-73<br><i>Arabidopsis thaliana</i> succinate dehydrogenase [ubiquinone]               |
| 5B07 | <a href="#">gi 35208830 emb AJ583515.1 </a> <i>Cynara cardunculus</i> partial mRNA... <a href="#">40</a> 0.89<br>Unknown                                                                                                                                                                                             |
| 5B09 | <a href="#">gi 34146931 gb AC110200.9 </a> <i>Mus musculus</i> chromosome 16, clon... <a href="#">38</a> 4.3<br>Unknown                                                                                                                                                                                              |
| 5C06 | <a href="#">gi 20146831 gb AC025554.6 </a> <i>Homo sapiens</i> BAC clone RP11-488l... <a href="#">42</a> 0.37<br>Unknown                                                                                                                                                                                             |
| 5C07 | <a href="#">gi 32261235 dbj AP003835.3 </a> <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar... <a href="#">117</a> 1e-23<br><a href="#">gi 34897211 ref NM_185063.1 </a> <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar... <a href="#">62</a> 5e-07<br>Unknown                                                                        |
| 5C09 | <a href="#">gi 28862243 gb AC138393.2 </a> <i>Homo sapiens</i> chromosome 1 clone <a href="#">58</a> 7e-06<br>Unknown                                                                                                                                                                                                |
| 5C10 | <a href="#">gi 32129019 gb BT009468.1 </a> <i>Triticum aestivum</i> clone wr1.pk00... <a href="#">452</a> e-124<br><a href="#">gi 34913373 ref NM_193145.1 </a> <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar... <a href="#">94</a> 1e-16<br>Unknown / <i>Oryza sativa</i> putative DNA damage repair protein (B1147B04.7). |
| 5C12 | <a href="#">gi 21553250 gb AC093151.2 </a> <i>Homo sapiens</i> chromosome 1 clone ... <a href="#">44</a> 0.11<br>Unknown                                                                                                                                                                                             |
| 5D01 | <a href="#">gi 38348156 gb AC112998.15 </a> <i>Mus musculus</i> chromosome 3, clon... <a href="#">40</a> 1.1<br>Unknown                                                                                                                                                                                              |
| 5D07 | <a href="#">gi 32400807 gb AF475114.1 </a> <i>Triticum aestivum</i> 60s ribosomal ... <a href="#">129</a> 1e-27<br><a href="#">gi 32400807 gb AF475114.1 </a> <i>Triticum aestivum</i> 60s ribosomal ... <a href="#">129</a> 1e-27<br>Unknown / <i>Triticum aestivum</i> 60s ribosomal protein L21                   |
| 5D09 | <a href="#">gi 32985149 dbj AK099940.1 </a> <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar... <a href="#">438</a> e-120<br>Unknown                                                                                                                                                                                           |
| 5D10 | <a href="#">gi 33237632 gb AE017163.1 </a> <i>Prochlorococcus marinus</i> subsp. m... <a href="#">42</a> 0.32<br>Unknown                                                                                                                                                                                             |
| 5E01 | <a href="#">gi 21664286 emb X67711.2 OSHSC70A</a> <i>O. sativa</i> hsp70 gene for h... <a href="#">712</a> 0.0<br><a href="#">gi 21664286 emb X67711.2 OSHSC70A</a> <i>O. sativa</i> hsp70 gene for h... <a href="#">712</a> 0.0                                                                                     |

|      |                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 5E02 | Oryza sativa heat shock protein 70 (hsp70)<br>gi 32488072 emb AL606458.3 OSJN00005 Oryza sativa genomic D.. <a href="#">62</a> 5e-07<br>Unknown                                                                                                                     |
| 5E06 | gi 1041422 emb X92402.1 HVALEYDEH H. vulgare mRNA for aminol... <a href="#">684</a> 0.0<br>gi 1041422 emb X92402.1 HVALEYDEH H. vulgare mRNA for aminol. <a href="#">684</a> 0.0<br>Hordeum vulgare aminolevulinate dehydratase                                     |
| 5E09 | gi 21955481 gb AF479764.1  Triticum aestivum glutathione-S-... <a href="#">234</a> 3e-59<br>gi 21955481 gb AF479764.1  Triticum aestivum glutathione-S-... <a href="#">234</a> 3e-59<br>Triticum aestivum glutathione-S-transferase 28e45                           |
| 5F08 | gi 21207475 gb AY104397.1  Zea mays PCO152838 mRNA. <a href="#">101</a> 6e-19<br>gi 3850815 emb Y18348.1 OSA18348 Oryza sativa mRNA for U2 s... <a href="#">90</a> 2e-15<br>Unknown / Oryza sativa U2 snRNP auxiliary factor, small subunit 35b                     |
| 5F09 | gi 34898865 ref NM_185890.1  Oryza sativa (japonica cultivar... <a href="#">337</a> 7e-90<br>gi 34898865 ref NM_185890.1  Oryza sativa (japonica cultivar... <a href="#">337</a> 7e-90<br>Oryza sativa putative NADH dehydrogenase                                  |
| 5G01 | gi 27228870 gb AC104838.3  Homo sapiens chromosome 1 clone ... <a href="#">40</a> 0.70<br>Unknown                                                                                                                                                                   |
| 5G02 | gi 21240732 gb AC112220.2  Homo sapiens chromosome 3 clone ... <a href="#">42</a> 0.31<br>Unknown                                                                                                                                                                   |
| 5G03 | gi 32986297 dbj AK101088.1  Oryza sativa (japonica cultivar... <a href="#">98</a> 7e-18<br>gi 29691167 gb AY224189.1  Medicago truncatula adenosylhomo... <a href="#">60</a> 1e-06<br>Unknown                                                                       |
| 5G07 | gi 37547240 ref XM_292853.2  Homo sapiens similar to zinc f... <a href="#">40</a> 1.3<br>Unknown                                                                                                                                                                    |
| 5G08 | gi 21207270 gb AY104192.1  Zea mays PCO077725 mRNA. <a href="#">216</a> 3e-53<br>gi 30682567 ref NM_101072.3  Arabidopsis thaliana pyrophosp... <a href="#">105</a> 7e-20<br>Unknown / Arabidopsis thaliana pyrophosphate-fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase |
| 5G09 | gi 32129026 gb BT009475.1  Triticum aestivum clone wr1.pk00... <a href="#">837</a> 0.0<br>gi 416280 dbj D21106.1 RICSS287 Rice mRNA for glutaminyl-IR... <a href="#">92</a> 1e-15<br>Unknown                                                                        |
| 5G11 | gi 7267032 emb AL133283.9  Human DNA sequence from clone RP <a href="#">46</a> 0.047<br>Unknown                                                                                                                                                                     |
| 5H06 | gi 20429641 gb AC098874.6  Homo sapiens BAC clone RP11-1299... <a href="#">38</a> 1.9<br>Unknown                                                                                                                                                                    |
| 6A02 | gi 23504748 emb AJ440796.1 TAE440796 Triticum aestivum mRNA <a href="#">412</a> e-112<br>gi 23504748 emb AJ440796.1 TAE440796 Triticum aestivum mRNA <a href="#">412</a> e-112<br>Triticum aestivum glutathione transferase F1 (gstf1)                              |
| 6A06 | gi 37991328 dbj AK121705.1  Oryza sativa (japonica cultivar... <a href="#">347</a> 8e-93<br>Unknown                                                                                                                                                                 |
| 6A07 | gi 31880067 gb AC093921.2  Oryza sativa (japonica cultivar... <a href="#">76</a> 5e-11<br>Unknown                                                                                                                                                                   |



|      |                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 6B11 | Unknown<br>gi 32128845 gb BT009294.1  Triticum aestivum clone wim1.pk0... <a href="#">105</a> 6e-21                                                                                                                                                                   |
| 6B12 | Unknown<br>gi 21207917 gb AY104839.1  Zea mays PCO137857 mRNA <a href="#">242</a> 2e-61<br>gi 34897627 ref NM_185271.1  Oryza sativa (japonica cultivar... <a href="#">180</a> 6e-43<br>Unknown / Oryza sativa cytoplasmic ribosomal protein L18                      |
| 6D03 | gi 2246624 gb AF004947.1 AF004947 Oryza sativa protein kina... <a href="#">143</a> 3e-31<br>gi 2246624 gb AF004947.1 AF004947 Oryza sativa protein kina... <a href="#">143</a> 3e-31<br>Unknown / Oryza sativa protein kinase                                         |
| 6D07 | gi 21209889 gb AY106811.1  Zea mays PCO109530 mRNA <a href="#">62</a> 5e-07<br>gi 34895321 ref NM_184115.1  Oryza sativa (japonica cultivar... <a href="#">58</a> 8e-06<br>Unknown / Oryza sativa putative fructose-bisphosphate aldolase                             |
| 6D12 | gi 32976347 db AK066329.1  Oryza sativa (japonica cultivar... <a href="#">339</a> 2e-90<br>gi 34897627 ref NM_185271.1  Oryza sativa (japonica cultivar... <a href="#">212</a> 4e-52<br>Unknown / Oryza sativa cytoplasmic ribosomal protein L18                      |
| 6E05 | gi 32975600 db AK065582.1  Oryza sativa (japonica cultivar... <a href="#">135</a> 4e-29<br>Unknown                                                                                                                                                                    |
| 6E06 | gi 17939850 emb AJ271469.1 ATH271469 Arabidopsis thaliana m... <a href="#">70</a> 2e-09<br>gi 17939850 emb AJ271469.1 ATH271469 Arabidopsis thaliana m... <a href="#">70</a> 2e-09<br>Unknown / Arabidopsis thaliana mitochondrial FO ATP synthase D chain (p_D gene) |
| 6E08 | gi 166974 gb M24426.1 BLYACPIII  Barley acyl carrier protein... <a href="#">311</a> 3e-82<br>gi 166974 gb M24426.1 BLYACPIII  Barley acyl carrier protein... <a href="#">311</a> 3e-82<br>Barley acyl carrier protein III (ACP III)                                   |
| 6E12 | gi 31075336 gb AC144716.2  Oryza sativa (japonica cultivar... <a href="#">42</a> 0.45<br>Unknown                                                                                                                                                                      |
| 6F02 | gi 32991200 db AK105991.1  Oryza sativa (japonica cultivar... <a href="#">76</a> 3e-11<br>Unknown                                                                                                                                                                     |
| 6F07 | gi 32968493 db AK058475.1  Oryza sativa (japonica cultivar... <a href="#">131</a> 3e-28<br>gi 2894147 emb AJ223492.1 TAIMA1 Triticum aestivum mRNA for... <a href="#">82</a> 2e-13<br>Unknown / Triticum aestivum mRNA for monomeric alpha-amylase inhibitor          |
| 6F10 | gi 32991745 db AK106536.1  Oryza sativa (japonica cultivar... <a href="#">329</a> 2e-87<br>Unknown                                                                                                                                                                    |
| 6G02 | gi 32988633 db AK103424.1  Oryza sativa (japonica cultivar... <a href="#">58</a> 2e-06<br>Unknown                                                                                                                                                                     |
| 6G03 | gi 17488735 gb AC027808.9  Homo sapiens chromosome 15, clon... <a href="#">42</a> 0.58<br>Unknown                                                                                                                                                                     |
| 6G11 | gi 32488862 emb AL606690.3 OSJN000080 Oryza sativa genomic D... <a href="#">42</a> 0.56<br>Unknown                                                                                                                                                                    |
| 6H01 | gi 32128648 gb BT009097.1  Triticum aestivum clone wkm2c.pk... <a href="#">260</a> 1e-66<br>gi 2429086 gb L37358.1 BLYLOXC Hordeum vulgare lipoxigenase <a href="#">220</a> 1e-54<br>Unknown                                                                          |



|      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |  |
|------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
|      | Unknown / Hordeum vulgare lipoxigenase 2 (LoxC)                                                                                                                                                                                                                                                                                     |  |
| 6H02 | <a href="#">gi 21664286 emb X67711.2 OSHSC70A</a> O sativa hsp70 gene for h... <a href="#">86</a> 2e-14<br><a href="#">gi 21664286 emb X67711.2 OSHSC70A</a> O sativa hsp70 gene for h... <a href="#">86</a> 2e-14<br>Unknown / Oryza sativa heat shock protein 70 (hsp70)                                                          |  |
| 6H07 | <a href="#">gi 21207225 gb AY104147.1</a> Zea mays PCO106418 mRNA <a href="#">301</a> 3e-79<br><a href="#">gi 30689864 ref NM_102496.2</a> Arabidopsis thaliana F-box pro... <a href="#">74</a> 1e-10<br>Unknown / Arabidopsis thaliana F-box protein family (At1g27340)                                                            |  |
| 6H08 | <a href="#">gi 37999321 gb AC108837.8</a> Mus musculus chromosome 15, clon... <a href="#">46</a> 0.008<br>Unknown                                                                                                                                                                                                                   |  |
| 6H11 | <a href="#">gi 21844683 gb AC121866.2</a> Mus musculus BAC clone RP24-114G <a href="#">44</a> 0.067<br>Unknown                                                                                                                                                                                                                      |  |
| 7A03 | <a href="#">gi 1724113 gb U80041.1 AFU80041</a> Avena fatua Af10-protein <a href="#">291</a> 3e-76<br><a href="#">gi 1724113 gb U80041.1 AFU80041</a> Avena fatua Af10-protein <a href="#">291</a> 3e-76<br>Avena fatua Af10-protein (clathrin assembly proteins)                                                                   |  |
| 7A04 | <a href="#">gi 32979938 db AK069974.1</a> Oryza sativa (japonica cultivar... <a href="#">90</a> 3e-15<br><a href="#">gi 25992761 gb AF546188.1</a> Contiguous genomic DNA sequence ... <a href="#">42</a> 0.73<br>Unknown                                                                                                           |  |
| 7A08 | <a href="#">gi 32975391 db AK065373.1</a> Oryza sativa (japonica cultivar... <a href="#">194</a> 6e-47<br>Unknown                                                                                                                                                                                                                   |  |
| 7A09 | <a href="#">gi 32976364 db AK066346.1</a> Oryza sativa (japonica cultivar... <a href="#">129</a> 2e-27<br>Unknown                                                                                                                                                                                                                   |  |
| 7A10 | <a href="#">gi 32977187 db AK067169.1</a> Oryza sativa (japonica cultivar... <a href="#">272</a> 6e-70<br>Unknown                                                                                                                                                                                                                   |  |
| 7A12 | <a href="#">gi 2431768 gb U62752.1 ZMU62752</a> Zea mays acidic ribosomal p... <a href="#">62</a> 4e-07<br><a href="#">gi 2431768 gb U62752.1 ZMU62752</a> Zea mays acidic ribosomal p... <a href="#">62</a> 4e-07<br>Unknown / Zea mays acidic ribosomal protein P1a (rpp1a)                                                       |  |
| 7B03 | <a href="#">gi 32261235 db AP003835.3</a> Oryza sativa (japonica cultivar... <a href="#">117</a> 1e-23<br><a href="#">gi 34897211 ref NM_185063.1</a> Oryza sativa (japonica cultiva... <a href="#">62</a> 5e-07<br>Unknown / Oryza sativa (japonica cultivar-group) putative indole-3-glycerol phosphate lyase (OSJNBA0094F01.12), |  |
| 7B04 | <a href="#">gi 21213136 gb AY109419.1</a> Zea mays CL26634.1 mRNA <a href="#">60</a> 1e-06<br><a href="#">gi 30690542 ref NM_119763.2</a> Arabidopsis thaliana ascorbate... <a href="#">54</a> 7e-05<br>Unknown / Arabidopsis thaliana ascorbate peroxidase, putative (At4g35970)                                                   |  |
| 7B06 | <a href="#">gi 37990507 db AK120884.1</a> Oryza sativa (japonica cultivar... <a href="#">266</a> 2e-68<br><a href="#">gi 8131702 db AB043976.1</a> Panax ginseng mRNA for ribosomal... <a href="#">131</a> 6e-28<br>Unknown / Panax ginseng mRNA for ribosomal protein L31                                                          |  |
| 7B09 | <a href="#">gi 32400866 gb AF479046.1</a> Triticum aestivum elongation fac... <a href="#">367</a> 5e-99<br><a href="#">gi 32400866 gb AF479046.1</a> Triticum aestivum elongation fac... <a href="#">367</a> 5e-99<br>Triticum aestivum elongation factor-1 alpha                                                                   |  |
| 7B10 | <a href="#">gi 32983970 db AK073947.1</a> Oryza sativa (japonica cultivar... <a href="#">787</a> 0.0<br>Unknown                                                                                                                                                                                                                     |  |

|      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|      | <a href="#">gil34914727 ref NM_193822.1</a>   <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar... <a href="#">291</a> 1e-75<br><i>Oryza sativa</i> cullin-like protein                                                                                                                                                                  |
| 7B11 | <a href="#">gil17226619 gb AF443296.1</a>   <i>Coturnix japonica</i> steroid recept... <a href="#">44</a> 0.16<br><a href="#">gil17226619 gb AF443296.1</a>   <i>Coturnix japonica</i> steroid recept... <a href="#">44</a> 0.16<br>Unknown                                                                                   |
| 7C03 | <a href="#">gil21207113 gb AY104035.1</a>   <i>Zea mays</i> PCO096331 mRNA <a href="#">147</a> 1e-32<br><a href="#">gil34895145 ref NM_184009.1</a>   <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar... <a href="#">84</a> 1e-13<br>Unknown / <i>Oryza sativa</i> putative 60S ribosomal protein L23A (P0440D10.20)                   |
| 7C04 | <a href="#">gil1928865 gb U91834.1 TAU91834</a>   <i>Triticum aestivum</i> root abun... <a href="#">757</a> 0.0<br><a href="#">gil30687470 ref NM_118843.2</a>   <i>Arabidopsis thaliana</i> 60S ribos... <a href="#">88</a> 2e-14<br>Unknown / <i>Arabidopsis thaliana</i> 60S ribosomal protein L14 (RPL14B)(Atg27090)      |
| 7C09 | <a href="#">gil21425438 emb AJ428849.1 CVA428849</a>   <i>Cynocephalus variegatu</i> <a href="#">42</a> 0.17<br>Unknown                                                                                                                                                                                                       |
| 7C10 | <a href="#">gil32989848 dbj AK104639.1</a>   <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar... <a href="#">40</a> 0.38<br>Unknown                                                                                                                                                                                                     |
| 7C12 | <a href="#">gil32990102 dbj AK104893.1</a>   <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar... <a href="#">137</a> 1e-29<br><a href="#">gil4151124 gb U90944.1 ZMU90944</a>   <i>Zea mays</i> PDI-like protein m... <a href="#">76</a> 3e-11<br>Unknown / <i>Zea mays</i> PDI-like protein                                            |
| 7D04 | <a href="#">gil32128747 gb BT009196.1</a>   <i>Triticum aestivum</i> clone wle1n.pk... <a href="#">783</a> 0.0<br>Unknown                                                                                                                                                                                                     |
| 7D05 | <a href="#">gil34907041 ref NM_189979.1</a>   <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar... <a href="#">321</a> 5e-85<br><a href="#">gil34907041 ref NM_189979.1</a>   <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar... <a href="#">321</a> 5e-85<br><i>Oryza sativa</i> putative transaldolase (P0482D04.14)                            |
| 7D07 | <a href="#">gil21216163 gb AY111573.1</a>   <i>Zea mays</i> CL2985_2 mRNA <a href="#">42</a> 0.57<br>Unknown                                                                                                                                                                                                                  |
| 7D08 | <a href="#">gil32468813 emb J99120.2 BSUB0017</a>   <i>Bacillus subtilis</i> complet... <a href="#">36</a> 4.6<br>Unknown                                                                                                                                                                                                     |
| 7D09 | <a href="#">J32972497 dbj AK062479.1</a>   <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar... <a href="#">299</a> 2e-78<br><a href="#">gil436031 gb L27107.1 TOB6RPLA</a>   <i>Nicotiana tabacum</i> (TSC40-4) <a href="#">86</a> 5e-14<br><i>Nicotiana tabacum</i> (TSC40-4) 60S ribosomal protein L34                                |
| 7D10 | <a href="#">gil34913419 ref NM_193168.1</a>   <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar... <a href="#">147</a> 1e-32<br><a href="#">gil34913419 ref NM_193168.1</a>   <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar... <a href="#">147</a> 1e-32<br>Unknown / <i>Oryza sativa</i> putative cinnamyl-alcohol dehydrogenase (B1129H01.12) |
| 7E01 | <a href="#">gil37991089 dbj AK121466.1</a>   <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar... <a href="#">163</a> 2e-37<br><a href="#">gil18390552 ref NM_100444.1</a>   <i>Arabidopsis thaliana</i> ankyrin r... <a href="#">48</a> 0.010<br>Unknown / <i>Arabidopsis thaliana</i> ankyrin                                          |
| 7E02 | <a href="#">gil32969007 dbj AK058989.1</a>   <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar... <a href="#">100</a> 3e-18<br>Unknown                                                                                                                                                                                                   |
| 7E04 | <a href="#">gil21206773 gb AY103695.1</a>   <i>Zea mays</i> PCO065803 mRNA <a href="#">228</a> 6e-57<br><a href="#">gil34911165 ref NM_192041.1</a>   <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar... <a href="#">174</a> 7e-41                                                                                                     |

|      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|      | Unknown / Oryza sativa putative 60S ribosomal protein L37a (B1144G04.30)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| 7E07 | <a href="#">gil37991790 gb JAK122144.1</a> Oryza sativa (japonica cultivar... <a href="#">80</a> 7e-12<br><a href="#">gil34907231 ref NM_190074.1</a> Oryza sativa (japonica cultivar... <a href="#">74</a> 4e-10<br>Unknown / Oryza sativa putative disease resistance protein 12 (P0504E02.12)<br><a href="#">gil32984240 gb JAK099031.1</a> Oryza sativa (japonica cultivar... <a href="#">220</a> 1e-54<br><a href="#">gil34899541 ref NM_186228.1</a> Oryza sativa (japonica cultivar... <a href="#">40</a> 2.0<br>Unknown / Oryza sativa putative receptor-type protein kinase LRK1 (OJ1606_D04.11)<br><a href="#">gil21216751 gb AY112161.1</a> Zea mays CL7520_-1 mRNA <a href="#">339</a> 2e-90<br>Unknown<br><a href="#">gil21213839 gb AY109921.1</a> Zea mays CL187_21 mRNA <a href="#">250</a> 8e-64<br><a href="#">gil32493111 gb AY323130.1</a> Oryza sativa (japonica cultivar... <a href="#">246</a> 1e-62<br>Oryza sativa (japonica cultivar-group) ribosomal protein large subunit 13<br><a href="#">gil21210280 gb AY107202.1</a> Zea mays PCO110869 mRNA <a href="#">52</a> 6e-04<br><a href="#">gil32966011 gb AY320037.1</a> Oryza sativa (japonica cultivar... <a href="#">40</a> 2.1<br>Unknown / Oryza sativa (japonica cultivar-group) RNA binding protein Rp120<br><a href="#">gil32128560 gb BT009009.1</a> Triticum aestivum clone wdk3c.pk... <a href="#">819</a> 0.0<br><a href="#">gil34909737 ref NM_191327.1</a> Oryza sativa (japonica cultivar... <a href="#">575</a> e-161<br>Oryza sativa aspartate aminotransferase (P0460E08.21)<br><a href="#">gil34905235 ref NM_189076.1</a> Oryza sativa (japonica cultivar... <a href="#">293</a> 8e-77<br><a href="#">gil34419229 gb BK000093.1</a> TPA: Oryza sativa cellulose syn... <a href="#">64</a> 1e-07<br>Unknown / Oryza sativa cellulose synthase-like D3 gene<br><a href="#">gil21209296 gb AY106218.1</a> Zea mays PCO136801 mRNA <a href="#">78</a> 7e-12<br>Unknown<br><a href="#">gil38093243 gb JAP005295.2</a> Oryza sativa (japonica cultivar... <a href="#">141</a> 6e-31<br><a href="#">gil30682189 ref NM_117335.2</a> Arabidopsis thaliana endomembr... <a href="#">72</a> 5e-10<br>Unknown / Arabidopsis thaliana endomembrane protein 70<br><a href="#">gil20562916 gb AY090545.1</a> Deschampsia antarctica clone Dac... <a href="#">781</a> 0.0<br><a href="#">gil20562916 gb AY090545.1</a> Deschampsia antarctica clone Dac... <a href="#">781</a> 0.0<br>Deschampsia antarctica clone Dacor 2.0 acetyl CoA synthetase<br><a href="#">gil32988114 gb JAK102905.1</a> Oryza sativa (japonica cultivar... <a href="#">557</a> e-155<br><a href="#">gil34906045 ref NM_189481.1</a> Oryza sativa (japonica cultivar... <a href="#">113</a> 5e-22<br>Unknown / Oryza sativa putative serine/threonine-specific protein kinase (P0518C01.36)<br><a href="#">gil32977175 gb JAK067157.1</a> Oryza sativa (japonica cultivar... <a href="#">303</a> 1e-79<br><a href="#">gil34894565 ref NM_183719.1</a> Oryza sativa (japonica cultivar... <a href="#">295</a> 3e-77<br>Oryza sativa putative branched chain alpha-keto acid dehydrogenase E2 subunit (B1011A07.31)<br><a href="#">gil21213426 gb AY109631.1</a> Zea mays CL5026_1 mRNA sequence <a href="#">278</a> 5e-72<br>Unknown<br><a href="#">gil24211087 gb AC105731.2</a> Oryza sativa (japonica cultivar... <a href="#">76</a> 8e-11<br>Unknown<br><a href="#">gil34366459 emb AL844876.4 CNS08CAZ</a> Oryza sativa chromosom <a href="#">222</a> 5e-55 |
| 7E08 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| 7E09 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| 7F02 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| 7F04 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| 7F06 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| 7F07 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| 7F08 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| 7F10 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| 7G01 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| 7G05 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| 7G09 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| 7H01 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| 7H02 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| 7H10 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |



|      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|      | <p><a href="#">gi 3309065 gb AF073488.1 AF073488</a> Zea mays bifunctional dihydrofolate reductase-thymidylate synthase (DHFR-TS) <a href="#">149</a> <a href="#">6e-33</a></p> <p><a href="#">gi 22204119 gb AY123418.1</a> Triticum aestivum putative ribos. ... <a href="#">480</a> <a href="#">e-133</a></p> <p><a href="#">gi 22204119 gb AY123418.1</a> Triticum aestivum putative ribos. ... <a href="#">480</a> <a href="#">e-133</a></p> <p>Triticum aestivum putative ribosomal protein S18</p> |
| 8A06 | <p><a href="#">gi 32986573 dbj AK101364.1</a> Oryza sativa (japonica cultivar. ... <a href="#">54</a> <a href="#">5e-05</a></p> <p><a href="#">gi 34899607 ref NM_186261.1</a> Oryza sativa (japonica cultivar. ... <a href="#">42</a> <a href="#">0.21</a></p> <p>Unknown / Oryza sativa putative aldol/keto reductase (OJ1351_C05.26)</p>                                                                                                                                                               |
| 8A07 | <p><a href="#">gi 170775 gb M90077.1 WHTTEF1X</a> Wheat translation elongation. ... <a href="#">48</a> <a href="#">0.006</a></p> <p><a href="#">gi 170775 gb M90077.1 WHTTEF1X</a> Wheat translation elongation. ... <a href="#">48</a> <a href="#">0.006</a></p> <p>Unknown / Wheat translation elongation factor 1 alpha-subunit (TEF1)</p>                                                                                                                                                             |
| 8A09 | <p><a href="#">gi 34013508 dbj AP005799.2</a> Oryza sativa (japonica cultivar. ... <a href="#">42</a> <a href="#">0.24</a></p> <p>Unknown</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| 8A10 | <p><a href="#">gi 23462855 gb AC008769.7</a> Homo sapiens chromosome 5 clone .. <a href="#">44</a> <a href="#">0.094</a></p> <p>Unknown</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| 8A12 | <p><a href="#">gi 6979318 gb AF172282.1 AF172282</a> Oryza sativa adh1-adh2 re. ... <a href="#">96</a> <a href="#">7e-17</a></p> <p><a href="#">gi 7211796 gb AF239615.1 AF239615</a> Manihot esculenta CRANTZ. . <a href="#">42</a> <a href="#">0.95</a></p> <p>Unknown</p>                                                                                                                                                                                                                              |
| 8B02 | <p><a href="#">gi 3309065 gb AF073488.1 AF073488</a> Zea mays bifunctional dihydrofolate reductase-thymidylate synthase (DHFR-TS) <a href="#">363</a> <a href="#">3e-97</a></p> <p><a href="#">gi 3309065 gb AF073488.1 AF073488</a> Zea mays bifunctional dihydrofolate reductase-thymidylate synthase (DHFR-TS) <a href="#">363</a> <a href="#">3e-97</a></p> <p>Zea mays bifunctional dihydrofolate reductase-thymidylate synthase (DHFR-TS)</p>                                                       |
| 8B04 | <p><a href="#">gi 32973276 dbj AK063258.1</a> Oryza sativa (japonica cultivar. ... <a href="#">141</a> <a href="#">3e-31</a></p> <p><a href="#">gi 30697429 ref NM_125472.2</a> Arabidopsis thaliana ABC trans. ... <a href="#">40</a> <a href="#">0.93</a></p> <p>Unknown / Arabidopsis thaliana ABC transporter family protein (At5g60790)</p>                                                                                                                                                          |
| 8B06 | <p><a href="#">gi 2627437 gb AF013613.1 AF013613</a> Fugu rubripes cosmid 48D1... <a href="#">40</a> <a href="#">0.58</a></p> <p>Unknown</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| 8B07 | <p><a href="#">gi 27375020 gb AC133478.2</a> Homo sapiens 3 BAC RP11-472P6 <a href="#">48</a> <a href="#">0.015</a></p> <p>Unknown</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| 8B09 | <p><a href="#">gi 21698 emb X66013.1 TACATHBG</a> T. aestivum gene for cathepsi... <a href="#">52</a> <a href="#">4e-04</a></p> <p><a href="#">gi 21698 emb X66013.1 TACATHBG</a> T. aestivum gene for cathepsi... <a href="#">52</a> <a href="#">4e-04</a></p> <p>Unknown / Triticum aestivum gene for cathepsin B (A116)</p>                                                                                                                                                                            |
| 8B10 | <p><a href="#">gi 24496451 gb AY145451.1</a> Hordeum vulgare actin mRNA, comp... <a href="#">272</a> <a href="#">2e-70</a></p> <p><a href="#">gi 24496451 gb AY145451.1</a> Hordeum vulgare actin mRNA, comp... <a href="#">272</a> <a href="#">2e-70</a></p> <p>Hordeum vulgare actin mRNA</p>                                                                                                                                                                                                           |
| 8C01 | <p><a href="#">gi 17536912 ref NM_061742.1</a> Caenorhabditis elegans putativ. ... <a href="#">38</a> <a href="#">1.0</a></p> <p>Unknown</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| 8C03 | <p><a href="#">gi 32950592 dbj AK105383.1</a> Oryza sativa (japonica cultivar. ... <a href="#">297</a> <a href="#">9e-78</a></p> <p>Unknown</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| 8C05 | <p><a href="#">gi 21211499 gb AY108421.1</a> Zea mays P0009381 mRNA <a href="#">359</a> <a href="#">4e-96</a></p> <p><a href="#">gi 12231278 dbj AB054003.1</a> Oryza sativa (japonica cultivar. ... <a href="#">285</a> <a href="#">4e-74</a></p>                                                                                                                                                                                                                                                        |

|      |  |                                                                                      |           |
|------|--|--------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
|      |  | Oryza sativa UDP-glucuronyltransferase-I                                             |           |
| 8C07 |  | gi 7248458 gb AF134579.1 AF134579.1 Zea mays clone AGPZm1 ara 46                     | 0.014     |
|      |  | gi 7248458 gb AF134579.1 AF134579.1 Zea mays clone AGPZm1 ara 46                     | 0.014     |
|      |  | Unknown / Zea mays clone AGPZm1 arabinogalactan protein (agp)                        |           |
| 8C10 |  | gi 26986185 emb AJ534445.1 HVUJ534445.1 Hordeum vulgare mRNA                         | 761 0.0   |
|      |  | gi 26986185 emb AJ534445.1 HVUJ534445.1 Hordeum vulgare mRNA                         | 761 0.0   |
|      |  | Hordeum vulgare mRNA for hexose transporter (stp1 gene)                              |           |
| 8C12 |  | gi 32982085 db AK072062.1 Oryza sativa (japonica cultivar...                         | 64 2e-07  |
|      |  | Unknown                                                                              |           |
| 8D08 |  | gi 4741845 gb AF112965.1 Triticum aestivum beta-1,3-glucan...                        | 161 1e-36 |
|      |  | gi 4741845 gb AF112965.1 Triticum aestivum beta-1,3-glucan...                        | 161 1e-36 |
|      |  | Unknown / Triticum aestivum beta-1,3-glucanase precursor (Gib3)                      |           |
| 8D12 |  | gi 21627589 gb AE003832.3 Drosophila melanogaster chromoso...                        | 40 1.2    |
|      |  | Unknown                                                                              |           |
| 8E01 |  | gi 32128620 gb BT009069.1 Triticum aestivum clone wia1c.pk...                        | 1356 0.0  |
|      |  | gi 30681853 ref NM_179303.1 Arabidopsis thaliana ATP citra...                        | 82 2e-12  |
|      |  | Unknown / Arabidopsis thaliana putative ATP citrate-lyase (At1g10670)                |           |
| 8E03 |  | gi 21215353 gb AY110763.1 Zea mays CL15281_1 mRNA sequence                           | 54 2e-04  |
|      |  | Unknown                                                                              |           |
| 8E04 |  | gi 18390096 gb AF466199.1 AF466199 Sorghum bicolor putative...                       | 186 1e-44 |
|      |  | gi 18390096 gb AF466199.1 AF466199 Sorghum bicolor putative...                       | 186 1e-44 |
|      |  | Unknown / Sorghum bicolor putative receptor protein kinase                           |           |
| 8E06 |  | 22297500 gb AC129912.2 Homo sapiens chromosome 11, clon...                           | 46 0.026  |
|      |  | Unknown                                                                              |           |
| 8E07 |  | gi 11559961 ref NM_022193.1 Rattus norvegicus acetyl-coenz...                        | 42 0.67   |
|      |  | gi 11559961 ref NM_022193.1 Rattus norvegicus acetyl-coenz...                        | 42 0.67   |
|      |  | Unknown / Rattus norvegicus acetyl-coenzyme A carboxylase (Acac)                     |           |
| 8F01 |  | gi 146639 gb J36020.1 ECOLIVRA E.coli high-affinity branche...                       | 42 0.27   |
|      |  | gi 146639 gb J36020.1 ECOLIVRA E.coli high-affinity branche...                       | 42 0.27   |
|      |  | Unknown / E. coli high-affinity branched-chain amino acid transport repressor (livR) |           |
| 8G01 |  | gi 20901861 gb AC112222.2 Homo sapiens chromosome 3 clone ...                        | 44 0.31   |
|      |  | Unknown                                                                              |           |
| 8G02 |  | gi 4098271 gb U76558.1 TAU76558 Triticum aestivum alpha-tub...                       | 412 e-112 |
|      |  | gi 4098271 gb U76558.1 TAU76558 Triticum aestivum alpha-tub...                       | 412 e-112 |
|      |  | Triticum aestivum alpha-tubulin                                                      |           |
| 8G03 |  | gi 10800055 db AP002861.2 Oryza sativa (japonica cultivar...                         | 38 2.2    |
|      |  | Unknown                                                                              |           |
| 8G04 |  | gi 28611028 emb AJ539160.1 TAE539160 Triticum aestivum sdh2...                       | 123 3e-26 |
|      |  | gi 28611028 emb AJ539160.1 TAE539160 Triticum aestivum sdh2...                       | 123 3e-26 |
|      |  | Triticum aestivum sdh2-rps14 gene (succinate dehydrogenase)                          |           |

|      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 8G06 | <a href="#">gi 2950242 emb Z98204.1 HVEXTEN</a> Hordeum vulgare mRNA for <a href="#">42</a> 0.22<br><a href="#">gi 2950242 emb Z98204.1 HVEXTEN</a> Hordeum vulgare mRNA for <a href="#">42</a> 0.22<br>Unknown / Hordeum vulgare putative extensin                                                                                                                                                             |
| 8G07 | <a href="#">gi 30680339 ref NM_100651.2 </a> Arabidopsis thaliana 40S ribos... <a href="#">264</a> 8e-68<br><a href="#">gi 30680339 ref NM_100651.2 </a> Arabidopsis thaliana 40S ribos... <a href="#">264</a> 8e-68<br>Arabidopsis thaliana 40S ribosomal protein S15A (RPS15a) (At1g07770)<br><a href="#">gi 31236815 ref XM_319480.1 </a> Anopheles gambiae ENSANGP000000 <a href="#">42</a> 0.35<br>Unknown |
| 8G12 | <a href="#">gi 21211930 gb AY108726.1 </a> Zea mays PCO143835 mRNA <a href="#">46</a> 0.021<br>Unknown                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| 8H05 | <a href="#">gi 32128968 gb BT009417.1 </a> Triticum aestivum clone wlmk1.pk... <a href="#">555</a> e-155<br><a href="#">gi 15626360 emb AJ345035.1 HVU345035</a> Hordeum vulgare partia <a href="#">555</a> e-155<br>Hordeum vulgare partial mRNA for monodehydroascorbate reductase                                                                                                                            |
| 8H06 | <a href="#">gi 30421164 gb AY268139.1 </a> Hordeum vulgare BAC 184G9, compl <a href="#">88</a> 1e-14<br><a href="#">gi 1199789 dbj D38111.1 WHTTFH1B</a> Wheat gene for transcripti... <a href="#">62</a> 6e-07<br>Unknown / Wheat gene for transcription factor HBP-1a(17)                                                                                                                                     |
| 8H12 | <a href="#">gi 37202135 gb AC139110.4 </a> Danio rerio clone CH211-154N18 s... <a href="#">42</a> 0.47<br>Unknown                                                                                                                                                                                                                                                                                               |

**Appendice A.3 : Analyse de séquence de 72 clones de la banque 5.**

L'analyse des séquences a été procédés à l'aide du script BLAST de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

Par la suite, les séquences identiques ont été isolées par le script de CAP Assembly (<http://bio.ifom-firc.it/ASSEMBLY/assemble.html>). Dans ces tableaux, la première ligne correspond à la plus forte homologie de séquence obtenue, la deuxième ligne correspond à une homologie assez forte avec un gène de fonction connue dans ce cas la troisième ligne mentionne la fonction hypothétique du gène dont serait issu l'insert SSH. Une synthèse et un classement du nombre de clone par catégories fonctionnelles ont ensuite été effectués et sont décrits dans le **Tableau 3.4**. De ces tableaux une représentation graphique a été réalisée et constitue la **Figure 3.17, partie B**.



| Clones | CAP assembly         | NCBI BLAST Best e-value<br>NCBI BLAST first know gene (e<1)                                                                                                                                                                                                                |
|--------|----------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 26A02+ | 26B02+               | <a href="#">gil37989656 dbj AK120033.1</a> Oryza sativa (japonica cultivar... <a href="#">208</a> 6e-51<br><a href="#">gil32400769 gb AF470356.1</a> Triticum aestivum QM mRNA, parti... <a href="#">172</a> 3e-40<br>Triticum aestivum QM protein                         |
| 26A03+ | 26F08+               | <a href="#">gil1928865 gb U91834.1 TAU91834</a> Triticum aestivum root abun... <a href="#">765</a> 0.0<br>Unknown                                                                                                                                                          |
| 26A04- | 26E01+               | <a href="#">gil6979318 gb AF172282.1 AF172282</a> Oryza sativa adh1-adh2 re... <a href="#">96</a> 7e-17<br>Unknown                                                                                                                                                         |
| 26A07- | 26F02+               | <a href="#">gil32128789 gb BT009238.1</a> Triticum aestivum clone wtk1.pk0... <a href="#">343</a> 6e-92<br><a href="#">gil34901883 ref NM_187399.1</a> Oryza sativa (japonica cultiva... <a href="#">200</a> 6e-49<br>Oryza sativa putative RNA Binding Protein            |
| 26A08+ | 26F06+               | <a href="#">gil37030051 gb AY382617.1</a> Oryza sativa (indica cultivar-gr... <a href="#">78</a> 5e-12<br><a href="#">gil30690542 ref NM_119763.2</a> Arabidopsis thaliana ascorbate... <a href="#">58</a> 4e-06<br>Arabidopsis thaliana ascorbate peroxidase              |
| 26A10+ | 26C12+ 26G05- 26D08+ | <a href="#">gil11995456 gb AF323586.1 AF323586</a> Oryza sativa aldehyde de. <a href="#">494</a> e-137<br><a href="#">gil11995456 gb AF323586.1 AF323586</a> Oryza sativa aldehyde de. <a href="#">494</a> e-137<br>Oryza sativa aldehyde dehydrogenase (ALDH)             |
| 26A11+ | 26G01- 26E09+        | <a href="#">gil32983288 dbj AK073265.1</a> Oryza sativa (japonica cultivar... <a href="#">359</a> 2e-96<br>Unknown                                                                                                                                                         |
| 26C01+ | 26D01+               | <a href="#">gil30139820 emb AL929204.7</a> Zebrafish DNA sequence from db... <a href="#">42</a> 0.21<br>Unknown                                                                                                                                                            |
| 26C04- | 26H02+               | <a href="#">gil21698 emb X66013.1 TACATHBG</a> T.aestivum gene for cathepsi... <a href="#">52</a> 4e-04<br><a href="#">gil21698 emb X66013.1 TACATHBG</a> T.aestivum gene for cathepsi... <a href="#">52</a> 4e-04<br>Triticum aestivum gene for cathepsin B               |
| 26D04- | 26C05+               | <a href="#">gil29466515 emb AL691474.2 9</a> Mouse DNA sequence from clone ... <a href="#">44</a> 0.21<br>Unknown                                                                                                                                                          |
| 26E03+ | 26E11+               | <a href="#">gil21212895 gb AY109330.1</a> Zea mays CL45_1 mRNA sequence <a href="#">281</a> 3e-73<br><a href="#">gil34908139 ref NM_190528.1</a> Oryza sativa (japonica cultiva... <a href="#">274</a> 7e-71<br>Oryza sativa putative HSP70                                |
| 26F09+ | 26G09+               | <a href="#">gil32985833 dbj AK100624.1</a> Oryza sativa (japonica cultivar... <a href="#">151</a> 7e-34<br>Unknown                                                                                                                                                         |
| 26H04+ | 26D12+               | <a href="#">gil32990001 dbj AK104792.1</a> Oryza sativa (japonica cultivar... <a href="#">228</a> 8e-57<br><a href="#">gil19347815 gb AY080718.1</a> Arabidopsis thaliana putative po... <a href="#">50</a> 0.004<br>Arabidopsis thaliana putative poly(A)-binding protein |
| 26A01  |                      | <a href="#">gil32976364 dbj AK066346.1</a> Oryza sativa (japonica cultivar... <a href="#">137</a> 9e-30<br>Unknown                                                                                                                                                         |
| 26A05  |                      | <a href="#">gil21209016 gb AY105938.1</a> Zea mays PCO134925 mRNA <a href="#">149</a> 3e-33<br><a href="#">gil34912833 ref NM_192875.1</a> Oryza sativa (japonica cultiva... <a href="#">74</a> 1e-10                                                                      |



|       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |  |
|-------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
|       | Oryza sativa putative embryogenesis-abundant protein                                                                                                                                                                                                                                                                   |  |
| 26A06 | <a href="#">gi 30682742 ref NM_120994.2 </a> Arabidopsis thaliana expressed... <a href="#">56</a> <a href="#">4e-06</a>                                                                                                                                                                                                |  |
| 26A09 | Unknown                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |  |
| 26B01 | <a href="#">gi 21907918 gb AP004902.1 </a> Lotus corniculatus var. japonica... <a href="#">40</a> <a href="#">2.4</a>                                                                                                                                                                                                  |  |
| 26B03 | Unknown                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |  |
| 26B04 | <a href="#">gi 27502356 ref NM_173185.1 </a> Mus musculus casein kinase 1, ... <a href="#">46</a> <a href="#">0.025</a>                                                                                                                                                                                                |  |
| 26B05 | Unknown                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |  |
| 26B07 | <a href="#">gi 14329977 emb AL365223.19 </a> Human DNA sequence from clone... <a href="#">44</a> <a href="#">0.055</a>                                                                                                                                                                                                 |  |
| 26B08 | <a href="#">gi 32988277 db AK103068.1 </a> Oryza sativa (japonica cultivar... <a href="#">198</a> <a href="#">3e-48</a><br><a href="#">gi 20269232 db AB037135.2 </a> Oryza sativa (japonica cultivar... <a href="#">182</a> <a href="#">2e-43</a><br>Oryza sativa OsORC1 for origin recognition complex 1             |  |
| 26B09 | <a href="#">gi 5354157 gb AF149841.1 AF149841</a> Arabidopsis thaliana diga... <a href="#">62</a> <a href="#">1e-06</a><br><a href="#">gi 5354157 gb AF149841.1 AF149841</a> Arabidopsis thaliana diga... <a href="#">62</a> <a href="#">1e-06</a><br>Arabidopsis thaliana digalactosylidiacylglycerol synthase (DGD1) |  |
| 26B10 | <a href="#">gi 4098271 gb U76558.1 TAU76558</a> Triticum aestivum alpha-tub... <a href="#">545</a> <a href="#">e-152</a><br><a href="#">gi 4098271 gb U76558.1 TAU76558</a> Triticum aestivum alpha-tub... <a href="#">545</a> <a href="#">e-152</a><br>Triticum aestivum alpha-tubulin                                |  |
| 26B11 | <a href="#">gi 32488862 emb AL606690.3 IOSJNC0080</a> Oryza sativa genomic D... <a href="#">42</a> <a href="#">0.57</a>                                                                                                                                                                                                |  |
| 26C02 | Unknown                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |  |
| 26C05 | <a href="#">gi 32129064 gb BT009513.1</a> Triticum aestivum clone wr1.pk00... <a href="#">404</a> <a href="#">e-110</a><br><a href="#">gi 14538026 gb AF387085.1 AF387085</a> Triticum aestivum glutat... <a href="#">343</a> <a href="#">8e-92</a><br>Triticum aestivum glutathione S-transferase                     |  |
| 26C06 | <a href="#">gi 32970441 db AK060423.1 </a> Oryza sativa (japonica cultivar... <a href="#">96</a> <a href="#">4e-17</a>                                                                                                                                                                                                 |  |
| 26D01 | Unknown                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |  |
| 26D02 | <a href="#">gi 32979831 db AK069807.1 </a> Oryza sativa (japonica cultivar... <a href="#">204</a> <a href="#">8e-50</a>                                                                                                                                                                                                |  |
| 26D03 | Unknown                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |  |
| 26D05 | <a href="#">gi 33300796 gb AC124563.4 </a> Mus musculus BAC clone RP23-206B... <a href="#">42</a> <a href="#">0.83</a><br><a href="#">gi 14715419 emb AL359317.3 CNS05TDQ</a> Human chromosome 14 <a href="#">38</a> <a href="#">6.0</a>                                                                               |  |
| 26D06 | Unknown                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |  |
| 26D07 | <a href="#">gi 15321574 gb AC021193.7 </a> Homo sapiens BAC clone RP11-774G... <a href="#">46</a> <a href="#">0.013</a>                                                                                                                                                                                                |  |
| 26D08 | Unknown                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |  |
| 26D09 | <a href="#">gi 22204499 emb AL732430.5 </a> Mouse DNA sequence from clone R... <a href="#">40</a> <a href="#">0.97</a>                                                                                                                                                                                                 |  |
| 26D10 | Unknown                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |  |
| 26D11 | <a href="#">gi 29604389 db AP005024.1 </a> Streptomyces avermitilis genomi... <a href="#">40</a> <a href="#">2.4</a>                                                                                                                                                                                                   |  |
| 26D12 | Unknown                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |  |
| 26D13 | <a href="#">gi 34910447 ref NM_191682.1 </a> Oryza sativa (japonica cultivar... <a href="#">246</a> <a href="#">3e-62</a>                                                                                                                                                                                              |  |

|       |                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|-------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|       | <a href="#">gil34910447 ref NM_191682.1</a> Oryza sativa (japonica cultivar... <a href="#">246</a> 3e-62<br>Oryza sativa putative casein kinase I                                                                                                                           |
| 26D06 | <a href="#">gil21210098 db AY107020.1</a> Zea mays PCO062840 mRNA <a href="#">98</a> 6e-18<br>Unknown                                                                                                                                                                       |
| 26D07 | <a href="#">gil27452893 db AC117498.6</a> Homo sapiens 12 BAC RP11-579D7 <a href="#">42</a> 0.63<br>Unknown                                                                                                                                                                 |
| 26D08 | <a href="#">gil7268185 emb AL161492.2 ATCHRIV4</a> Arabidopsis thaliana DNA... <a href="#">42</a> 0.46<br>Unknown                                                                                                                                                           |
| 26D10 | <a href="#">gil32994918 db AK109709.1</a> Oryza sativa (japonica cultivar... <a href="#">52</a> 8e-04<br><a href="#">gil32994918 db AK109709.1</a> Oryza sativa (japonica cultivar... <a href="#">52</a> 8e-04<br>Unknown                                                   |
| 26D11 | <a href="#">gil14317905 db AB052133.1</a> Triticum aestivum tck2a mRNA fo... <a href="#">287</a> 7e-75<br><a href="#">gil14317905 db AB052133.1</a> Triticum aestivum tck2a mRNA fo... <a href="#">287</a> 7e-75<br>Triticum aestivum tck2a mRNA for casein kinase II alpha |
| 26E08 | <a href="#">gil1132482 db D17760.1 RICARE</a> Oryza sativa (japonica culti... <a href="#">88</a> 9e-15<br><a href="#">gil1132482 db D17760.1 RICARE</a> Oryza sativa <a href="#">88</a> 9e-15<br>Oryza sativa ADP-ribosylation factor                                       |
| 26E11 | <a href="#">gil21212895 db AY109330.1</a> Zea mays CL45_1 mRNA <a href="#">281</a> 3e-73<br><a href="#">gil34908139 ref NM_190528.1</a> Oryza sativa (japonica cultivar... <a href="#">274</a> 7e-71<br>Oryza sativa putative HSP70                                         |
| 26E12 | <a href="#">gil21734928 db AC008742.9</a> Homo sapiens chromosome 19 <a href="#">46</a> 0.023<br>Unknown                                                                                                                                                                    |
| 26F01 | <a href="#">gil32400864 db AF479045.1</a> Triticum aestivum S28 ribosomal ... <a href="#">321</a> 4e-85<br><a href="#">gil32400864 db AF479045.1</a> Triticum aestivum S28 ribosomal ... <a href="#">321</a> 4e-85<br>Triticum aestivum S28 ribosomal protein               |
| 26F03 | <a href="#">gil14702142 emb AL450312.10</a> Human DNA sequence from clone ... <a href="#">40</a> 1.1<br>Unknown                                                                                                                                                             |
| 26F10 | <a href="#">gil28626580 db AC140119.3</a> Homo sapiens 3 BAC RP11-747D18 <a href="#">42</a> 0.69<br>Unknown                                                                                                                                                                 |
| 26F11 | <a href="#">gil34907041 ref NM_189979.1</a> Oryza sativa (japonica cultivar... <a href="#">323</a> 1e-85<br><a href="#">gil34907041 ref NM_189979.1</a> Oryza sativa (japonica cultivar... <a href="#">323</a> 1e-85<br>Oryza sativa putative transaldolase                 |
| 26F12 | <a href="#">gil37536539 ref NM_197590.1</a> Oryza sativa (japonica cultivar... <a href="#">450</a> e-123<br><a href="#">gil37536539 ref NM_197590.1</a> Oryza sativa (japonica cultivar... <a href="#">450</a> e-123<br>Oryza sativa putative ubiquitin protein             |
| 26G03 | <a href="#">gil32972497 db AK062479.1</a> Oryza sativa (japonica cultivar... <a href="#">264</a> 9e-68<br><a href="#">gil30689385 ref NM_113811.2</a> Arabidopsis thaliana 60S ribos... <a href="#">72</a> 7e-10<br>Arabidopsis thaliana 60S ribosomal protein L34 (RPL34C) |
| 26G04 | <a href="#">gil21210280 db AY107202.1</a> Zea mays PCO110869 mRNA <a href="#">50</a> 0.002<br>Unknown                                                                                                                                                                       |

|       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|-------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 26G07 | <a href="#">gi 23320931 emb AL713967.18 </a> Mouse DNA sequence from clone ... <a href="#">40</a> <a href="#">0.87</a><br>Unknown                                                                                                                                                                         |
| 26G09 | <a href="#">gi 32985833 dbj AK100624.1 </a> Oryza sativa (japonica cultivar... <a href="#">151</a> <a href="#">7e-34</a><br>Unknown                                                                                                                                                                       |
| 26G11 | <a href="#">gi 18767525 gb AC098657.2 </a> Homo sapiens chromosome 1 clone ... <a href="#">42</a> <a href="#">0.38</a><br>Unknown                                                                                                                                                                         |
| 26G12 | <a href="#">gi 12584389 emb AL354937.12 </a> Human DNA sequence from clone <a href="#">44</a> <a href="#">0.13</a><br>Unknown                                                                                                                                                                             |
| 26H02 | <a href="#">gi 21698 emb X66013.1 TACATHBG</a> T.aestivum gene for cathepsi... <a href="#">44</a> <a href="#">0.097</a><br>Unknown                                                                                                                                                                        |
| 26H06 | <a href="#">gi 1944572 emb Z49146.1 HVPAL3MR</a> H.vulgare partial PAL mRNA <a href="#">147</a> <a href="#">1e-32</a><br><a href="#">gi 1944572 emb Z49146.1 HVPAL3MR</a> H.vulgare partial PAL mRNA <a href="#">147</a> <a href="#">1e-32</a><br>Hordeum vulgare partial PAL phenylalanine ammonia-lyase |
| 26H07 | <a href="#">gi 27228870 gb AC104838.3 </a> Homo sapiens chromosome 1 clone ... <a href="#">40</a> <a href="#">0.69</a><br>Unknown                                                                                                                                                                         |
| 26H10 | <a href="#">gi 32977187 dbj AK067169.1 </a> Oryza sativa <a href="#">272</a> <a href="#">7e-70</a><br>Unknown                                                                                                                                                                                             |

**APPENDICE B**  
**DÉCLARATION D'INVENTION**

Appendice B.1 : Déclaration d'invention. .... 207

**Appendice B.1 : Déclaration d'invention.****Déclaration d'invention**

| Titre de l'invention        |  |
|-----------------------------|--|
| Procédés de Suppression PCR |  |

**Section 1. Inventeurs**

Veillez énumérer toutes les personnes qui auraient contribué à la conception ou à l'application de l'invention. Cette liste doit inclure le nom de toutes les personnes pouvant être reconnues comme les inventeurs légaux.

| Inventeur no 1                |                                                |                |                             |
|-------------------------------|------------------------------------------------|----------------|-----------------------------|
| Nom                           | Franck Tarendeau                               | Citoyenneté    | Française                   |
| Statut au travail             | Étudiant au Doctorat                           |                |                             |
| <b>Adresses</b>               |                                                |                |                             |
| Domicile                      | 1 rue Frérotte 33500 Lalande de Pomerol FRANCE |                |                             |
| Université/Cie                | Université du Québec à Montréal                |                |                             |
| <b>Numéro(s) de téléphone</b> |                                                |                |                             |
| Domicile                      | 01133557513036                                 | Université/Cie | 01133476882092              |
| Fax :                         |                                                | Courriel       | franck.tarendeau@wanadoo.fr |

| Inventeur no 2                |                                   |                |                     |
|-------------------------------|-----------------------------------|----------------|---------------------|
| Nom                           | Mario Houde                       | Citoyenneté    | Canadienne          |
| Statut au travail             | Professeur                        |                |                     |
| <b>Adresses</b>               |                                   |                |                     |
| Domicile                      | 191 Lemoyne Est Longueuil J4H 1V1 |                |                     |
| Université/Cie                | Université du Québec à Montréal   |                |                     |
| <b>Numéro(s) de téléphone</b> |                                   |                |                     |
| Domicile                      | 450-646-9046                      | Université/Cie | 514-987-3000-3964   |
| Fax :                         | 514-987-4647                      | Courriel       | houde.mario@uqam.ca |

| Inventeur no 3                |  |                |  |
|-------------------------------|--|----------------|--|
| Nom                           |  | Citoyenneté    |  |
| Statut au travail             |  |                |  |
| <b>Adresses</b>               |  |                |  |
| Domicile                      |  |                |  |
| Université/Cie                |  |                |  |
| <b>Numéro(s) de téléphone</b> |  |                |  |
| Domicile                      |  | Université/Cie |  |
| Fax :                         |  | Courriel       |  |



## Section 2. Description de l'invention/découverte

Les inventions peuvent inclure de nouveaux procédés, des logiciels, des méthodes, des produits, des appareils, des compositions, des organismes vivants ou des améliorations ou nouvelles utilisations d'inventions existantes.

| L'invention                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |     |                                  |                                         |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|----------------------------------|-----------------------------------------|
| <b>A. Titre de l'invention :</b><br>Procédés de Suppression PCR                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |     |                                  |                                         |
| <b>B. Brève description de l'invention</b><br><p>Dans le but d'isoler des gènes différentiellement exprimés ou d'enrichir des banques en gènes rares, de nombreuses techniques de biologie moléculaire ont été développées. L'une d'entre elles est l'Hybridation Suppressive Soustractive (SSH) utilisant la technologie de "PCR Suppression" (U.S. Patent Nos 5,565,340 and 5,759,822). La SSH est une technique largement utilisée à travers le monde. Cependant, elle génère souvent de nombreux clones faux positifs redondants ce qui a conduit un grand nombre de chercheurs à l'utiliser en combinaison avec d'autres techniques (DNA chips, mRNA Differential Display). Quelques modifications ont été proposées pour améliorer la SSH mais ces améliorations sont souvent peu efficaces (<i>Nucleic Acids Res.</i> 28, E90).</p> <p>L'invention présentée ici consiste en un nouveau procédé de "PCR Suppression". Elle repose sur une hypothèse quant à l'origine des clones faux positifs redondants et son efficacité a été validée en laboratoire. L'invention peut directement s'appliquer à la SSH ou à tout procédés souhaitant supprimer l'amplification de fragment d'ADN lors de Réactions de Polymérisation en Chaîne (PCR). Pour une efficacité optimale, elle requiert le procédé de suppression (par formation de structures en "épingle à cheveux") qui est déjà protégé (U.S. Patent No 5,565,340). La PCR est une technologie brevetée nécessaire à la découverte. L'invention est basée sur 2 innovations : le remplissage des extrémités (Filling the ends) et l'ajout d'ARN lors de PCR (hétéroduplex ARN/ADN).</p> <p>Le remplissage des extrémités consiste à hybrider 2 brins d'ADN : un brin digéré avec une enzyme de restriction puis ligué à un adaptateur avec un brin non digéré. A l'aide d'une ADN polymérase sans activité exonucléase, une séquence d'acide nucléique complémentaire au brin non-digéré est ajoutée sur le brin digéré. Cette étape élimine donc la possibilité d'ajouter une séquence d'adaptateur sur chaque extrémité du brin digéré. Pour s'assurer qu'aucune séquence ne sera présente sur les 2 extrémités de brins digérés ou de brins non-digérés, l'utilisation d'ADN polymérase sans activité exonucléase (incapable de corriger les hybridations incorrectes) est nécessaire. Ainsi, un brin ayant subi un remplissage des extrémités ne peut pas être amplifié par une PCR utilisant des amorces de séquences complémentaires à celles des adaptateurs.</p> <p>L'ajout d'ARN lors de PCR conduit à la formation d'hétéroduplex ARN/ADN. Ces molécules hybrides ne peuvent être utilisées comme matrice par les ADN polymérases. Ainsi, il se crée alors une compétition entre les ARN qui vont former des molécules hétéroduplex avec leurs ADN complémentaires et les amorces qui veulent se fixer sur leurs ADN cibles. Il en résulte un retard, voire une inhibition, de l'amplification des ADN pouvant former des hybrides avec des molécules d'ARN.</p> <p>Ces améliorations ont été effectuées avec succès sur des expériences de SSH réalisées au laboratoire: elles permettent d'augmenter l'efficacité du précédent procédé de "PCR Suppression" (U.S. Patent No 5,565,340) et ainsi de sélectionner plus aisément des gènes d'intérêt.</p> |     |                                  |                                         |
| <b>C. Une description détaillée de l'invention a-t-elle été fournie et annexée?</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | Oui | <input checked="" type="radio"/> | Non <input type="radio"/>               |
| Si non, date attendue :                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |     |                                  |                                         |
| <b>D. Cette invention est-elle en relation avec d'autres inventions ou brevets que vous auriez précédemment faites ou obtenus?</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | Oui | <input type="checkbox"/>         | Non <input checked="" type="checkbox"/> |
| Si oui veuillez donner les détails et fournir les copies s'il y a lieu :                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |     |                                  |                                         |



### Section 3. Publications, communications et diffusion publique en rapport avec l'invention

L'accessibilité à la protection en rapport avec l'invention peut dépendre des réponses à cette section, il faut donc y apporter un soin particulier.

| Détails concernant les inventeurs et leurs institutions respectives                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                             |     |                                |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|--------------------------------|
| <b>A</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | La découverte a-t-elle fait l'objet de communications, publications, présentations à l'interne ou l'externe etc...?                                         | Oui | X Non <input type="checkbox"/> |
| <p>Si oui veuillez fournir les copies et donner les détails dont les dates de publication ou de communication.</p> <p>(2003)-Séminaire dans le cadre du Doctorat en Biologie<br/>           (2003)-Poster: 7th International Congress of Plant Molecular Biology (ISPMB2003).<br/>           (2003)-Présentation orale: Institut de Recherche en Biologie Végétale (IRBV).<br/>           (2002)-Poster: Annual Congress of Canadian Society of Plant Physiologists (CSPP).<br/>           (2002)-Présentation orale: Congrès Annuel du TOXEN.<br/>           (2002)-Présentation orale: INRS-Institut Armand-Frappier.</p> <p>Seuls les résultats de l'utilisation de l'invention dans le cadre de la problématique du laboratoire sur l'aluminium et le blé ont été présentés.<br/>           L'intégralité des démarches expérimentales conduisant à l'invention n'ont pas été décrites.</p> |                                                                                                                                                             |     |                                |
| <b>B</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | Est-ce que des communications sont prévues dans les prochains mois?                                                                                         | Oui | X Non <input type="checkbox"/> |
| <p>Si oui donnez les détails</p> <p>Publication dans une revue scientifique en vue des résultats des travaux obtenus et de la démarche expérimentale innovante. La rédaction de l'article est en cours et devrait être proposé à un périodique dans un délai de 2 mois.</p> <p>Soutenance de la thèse dans le cadre du Doctorat en Biologie de l'Université du Québec à Montréal: Été 2004.</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                             |     |                                |
| <b>C</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | Est-ce que du matériel, des résultats ou documents en rapport avec l'invention ont déjà fait l'objet d'une entente de transfert ou d'un échange quelconque? | Oui | <input type="checkbox"/> Non X |
| <p>Si oui veuillez donner les détails et fournir une copie des documents appropriés si il y a lieu..</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                             |     |                                |
| <b>D</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | Des ententes de confidentialité ont-elles été signées en rapport avec certains aspects de la recherche ayant mené à l'invention?                            | Oui | <input type="checkbox"/> Non X |
| <p>Si oui veuillez fournir des copies.</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                             |     |                                |





**Section 5. Détails concernant subvention(s) et commanditaire(s) du projet**

| Détails concernant les inventeurs et leurs institutions respectives                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                          |                        |                                     |                                         |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------------|
| A. Cette invention découle-t-elle:                                                                                                                                                         | a) d'un contrat?                                                                                                                                                                                         | Oui                    | <input type="checkbox"/>            | Non <input checked="" type="checkbox"/> |
|                                                                                                                                                                                            | b) d'une subvention                                                                                                                                                                                      | Oui                    | <input checked="" type="checkbox"/> | Non <input type="checkbox"/>            |
|                                                                                                                                                                                            | c) d'une collaboration inter-universitaire?                                                                                                                                                              | Oui                    | <input type="checkbox"/>            | Non <input checked="" type="checkbox"/> |
|                                                                                                                                                                                            | c) d'une entente de transfert de matériel?                                                                                                                                                               | Oui                    | <input type="checkbox"/>            | Non <input checked="" type="checkbox"/> |
| Détails s'il y a lieu :                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                                                                                          |                        |                                     |                                         |
| B                                                                                                                                                                                          | Nom(s) du ou des organismes ayant financé le projet                                                                                                                                                      | CRSNG et Génome Québec |                                     |                                         |
| Donnez les détails                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                          |                        |                                     |                                         |
| C                                                                                                                                                                                          | Est-ce que la découverte a été déclarée au « commanditaire »?                                                                                                                                            | Oui                    | <input type="checkbox"/>            | Non <input checked="" type="checkbox"/> |
| Si oui donnez les détails<br>Le CRSNG accorde l'entière propriété intellectuelle au chercheur.<br>La découverte sera déclarée à Génome Québec suite au dépôt à l'UQAM.                     |                                                                                                                                                                                                          |                        |                                     |                                         |
| D                                                                                                                                                                                          | Est-ce qu'une entente préalable en rapport avec les conditions de partage de la propriété intellectuelle a été signée entre les partenaires ayant financé le projet et ceux ayant exécuté la découverte? | Oui                    | <input checked="" type="checkbox"/> | Non <input type="checkbox"/>            |
| Si oui fournissez une copie de cette entente et donnez les détails pertinents : Une entente sur le partage de la propriété intellectuelle a déjà été signée entre l'UQAM et Génome Québec. |                                                                                                                                                                                                          |                        |                                     |                                         |

**Section 6. Renseignements complémentaires utiles aux démarches en vue d'un demande de brevet.**

| Brevetabilité                                                                                                             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>A</b>                                                                                                                  | <p>En prévision d'une recherche de brevets antérieurs lors des démarches de prise de brevet, veuillez donner des mots clés en regard avec l'invention.</p> <p>PCR Suppression (méthode de)<br/>           Suppression Subtractive Hybridization (technique de)<br/>           Representational Difference Analysis (technique de)<br/>           Suppression (méthodes de)</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| <p>Une invention, pour être brevetable, doit répondre à trois critères : 1) utilité, 2) nouveauté et 3) non-évidence.</p> |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| <b>B</b>                                                                                                                  | <p>En quoi cette technologie est-elle utile? Quelles sont les applications immédiates et futures prévues pour l'invention? Veuillez être très descriptif.</p> <p>Cette technologie permet d'éliminer l'amplification de fragments d'ADN non désiré lors de PCR. Sa nouveauté repose sur l'utilisation inhabituelle d'enzymes de restriction, des ADN polymérases non correctrices ainsi que des ARN. En fait, elle permet d'aller rechercher plus finement des gènes d'intérêts et de mieux normaliser les librairies générées.</p> <p>Les applications de l'invention sont sa commercialisation immédiate. En effet, l'invention est directement applicable au Kit PCR Select™ cDNA Subtraction de BD Sciences (CLONTECH, Catalog #: K1804-1). CLONTECH a mis au point le précédent procédé de PCR Suppression par structures en "épingle à cheveux" (U.S. Patent Nos. 5,565,340) et commercialise sa méthode dans le kit précédemment cité. Ce kit est le seul produit d'Hybridation Suppressive Soustractive (SSH) mis sur le marché, CLONTECH détenant les droits de leur méthode de PCR suppressive.</p> <p>Tout comme la méthode de CLONTECH, l'invention décrite ici n'est pas limitée à la SSH mais peut s'appliquer à tout procédé utilisant une étape PCR.</p> |
| <b>C</b>                                                                                                                  | <p>En quoi cette technologie est-elle nouvelle? Spécifiez, à votre connaissance, les aspects novateurs.</p> <p>Les aspects novateurs sont l'utilisation inhabituelle d'enzymes de restriction, l'utilisation d'ADN polymérases non correctrices ainsi que d'ARN. Ces aspects sont concrétisés par le remplissage des extrémités des duplex ADN et la formation d'hétéroduplex ADN/ARN comme répresseurs de réactions d'amplification en chaîne (PCR).</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |

| ... Brevetabilité (suite) |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|---------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| D.                        | <p>En quoi cette technologie est-elle non-évidente? (La non-évidence signifie qu'à la lecture des informations scientifiques publiques il ne serait pas évident de conduire à cette invention).</p> <p>La non-évidence de la technologie repose sur la détermination de la raison pour laquelle les précédentes techniques de biologie moléculaire présentent des faiblesses d'efficacité sur la suppression de l'amplification de fragment lors d'étapes PCR. Afin de comprendre ces faiblesses, il faut faire la revue bibliographique et l'analyse des différents procédés méthodologiques proposés à travers le monde, intégrer les différents résultats obtenus par les équipes de recherche et dresser une hypothèse quant à l'origine des amplifications indésirables. L'hypothèse ayant mené à la réalisation de l'invention a été que la baisse d'efficacité de suppression lors de PCR des méthodes actuelles serait due à l'amplification non désirée d'ADN par le fait de l'utilisation non contrôlée d'adaptateurs. En d'autres termes, des fragments d'ADN indésirables se retrouvent amplifiés par la présence de séquence d'adaptateurs ajoutés accidentellement par les ADN polymérases.</p> |
| E.                        | <p>En quoi cette technologie offre-t-elle des avantages par rapport aux autres technologies actuellement sur le marché?</p> <p>La technologie proposée permet d'augmenter l'efficacité des technologies actuellement sur le marché.</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| F.                        | <p>Des travaux en rapport avec l'invention sont-ils toujours en cours?      Oui      <input type="radio"/> Non      <input checked="" type="checkbox"/> X</p> <p>Si oui quels sont-ils?</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |

## ANNEXE

---

### INTRODUCTION

Dans beaucoup de systèmes biologiques, des changements significatifs de phénotype peuvent résulter dans des changements modestes de l'expression de certains gènes. Plusieurs approches sont utilisées pour identifier des gènes différentiellement exprimés : l'ARNm *Differential Display* (DD), filtres ou puces à ADN, *Serial Analysis of Gene Expression* (SAGE), *Massively Parallel Signature Sequencing* (MPSS) et l'Hybridation Suppressive Soustractive (SSH) (Liang et Pardee, 1992 ; Schena et al, 1995 ; Velculescu et al, 1995 ; Brenner et al, 2000 ; Diatchenko et al, 1996). Ces techniques ont habituellement beaucoup de difficultés à isoler des gènes rares d'intérêt pour différentes raisons : la sélection au hasard de la DD, les limites de détection des méthodes d'hybridation de filtres et puces à ADN, le nombre de clones et la génération de séquences très courtes (13 à 20 nucléotides) des SAGE et MPSS. La SSH est la seule technique qui tente d'enrichir une banque en ADNc d'intérêt (U.S. Patent Nos. 5,759,822 ; figure 1). Cependant, le nombre de clones représentants des ADNc non-différentiellement exprimés ou des ADNc trop abondants pour être normalisés (*background*) peut considérablement excéder celui des clones ciblés dans les banques soustraites (Rebrikov et al, 2000). C'est pourquoi la SSH est souvent utilisée en combinaison avec d'autres techniques dont le DD et les puces à ADN (Kang et al, 1998 ; Yang et al 1999 ; Hanazawa et al, 2001). De nombreuses hypothèses ont été faites pour expliquer l'origine du *background* durant la SSH et quelques modifications ont été proposées (Rebrikov et al, 2000 ; Kiss et al, 2003). Rebrikov et al (2000) ont suggéré que les faiblesses de soustraction ou de normalisation de la SSH proviendraient (i) d'une amplification non-spécifique des adaptateurs non-ligués ou (ii) d'une hybridation non-effectuée des ADNc redondants entre les molécules de *driver* et *tester*. Kiss et al (2003) ont pour leur part proposé que le *background* pourrait avoir comme origine (iii) des digestions et des ligations ADNc *tester* non-effectuées, ces molécules se comportant par la suite comme des molécules de *driver*. Cependant les modifications que ces 2 équipes de chercheurs ont apportées basées sur leurs hypothèses respectives n'ont montré que de très faibles améliorations. Les améliorations pouvant être apportées au protocole SSH représentent un enjeu commercial important puisque cette technique est très utilisée à travers le monde à la fois pour rechercher des gènes différentiellement exprimés (Diatchenko et al, 1998), des régions spécifiques de génome (Dwyer et al, 2004) mais aussi pour normaliser les banques d'ADNc lors de projets de génomique.

L'Hybridation Suppressive Soustractive (SSH, figure 1) est une technique de biologie moléculaire qui repose sur l'utilisation du procédé de "PCR Suppression" mis au point par la compagnie CLONTECH/BD Sciences (U.S. Patent Nos. 5,565,340) (figure 2). Cette technique est très utilisée pour rechercher des gènes différentiellement exprimés entre des états physiologiques différents cependant la communauté scientifique se heurte souvent au fait que la SSH ne présente pas toujours une efficacité très intéressante dans ce genre d'utilisation. En effet, la SSH est reconnue comme ayant plus un pouvoir de "normalisation" que de "soustraction" (Diatchenko et al, 1998) ce qui en fait un outil très intéressant pour la réalisation de banque d'ADNc où une représentation de chaque gène exprimé, rare ou abondant, est recherchée mais pas forcément une alternative idéale pour la recherche de gènes différentiellement exprimés ou de région spécifique de génome. Lors de recherche de gènes dérégulés, la faible efficacité de soustraction de la SSH se concrétise par la présence d'un nombre élevé de clones faux-positifs (codant pour des gènes non-dérégulés) ou *background*.

Ce niveau de *background* est reconnu être dépendant de 3 facteurs : (i) la qualité des ARN de départ, (ii) le rendement de la soustraction et (iii) surtout du choix des populations de *tester* et *driver* (Diatchenko et al, 1998 ; Desai et al, 2000). Desai et al (2000), les auteurs de la SSH, soulignent que plus les populations de *driver* et *tester* sont proches génétiquement, c'est à dire qu'il existe peu d'ARNm exprimés différentiellement entre elles, plus le *background* sera élevé. Cette présence de clones non-

soustrés (*background*) ne s'accorde pas avec l'idée de soustraction théorique de la technique et laisse en suspens un problème technique inhérent à la SSH.

Dans les cas où la SSH est utilisée comme outil de normalisation de banque d'ADNc, la faible efficacité de soustraction de la technique va se concrétiser par une sur-représentation des clones abondants dans les banques obtenues. Idéalement, lors de normalisation, un nombre unitaire de copie de chaque gène est recherché quelque soit leur abondance relative initiale. En améliorant la puissance de soustraction de la SSH il serait donc possible d'augmenter sa capacité de normalisation.

Une hypothèse a alors été posée par les membres de notre équipe quant à l'origine expérimentale du *background* lorsque la SSH est utilisée comme outil de soustraction. Ce *background* serait essentiellement originaire des molécules de type "c" et dans une plus moindre partie des molécules de type "a" (figure 3). Les molécules de type "c" acquièrent lors de l'étape de *filling* une séquence d'adaptateur (1) et (2). Ces molécules peuvent alors être amplifiées de façon linéaire (3). De par leur grande abondance (le *driver* étant mis en excès), il est très probable que ces molécules complémentaires nouvellement synthétisées (3) puissent se rencontrer et un *filling* intempestif par l'ADN polymérase peut alors se réaliser lors des étapes de PCR (4). Des molécules pouvant être amplifiées de façon exponentielle sont ainsi obtenues. De par leur provenance en excès du *driver*, la proportion de leurs amplifiats dans les banques SSH standard se retrouve ainsi élevée. Enfin, les molécules de types "a" pourraient participer à ce *background* par un procédé similaire (5).

A partir de cette hypothèse, différentes stratégies ont été développées au laboratoire pour tenter d'améliorer la technique SSH: la Suppression PCR par Remplissage des Extrémités et la Suppression PCR avec Ajout d'ARN. Ces 2 nouveaux procédés de Suppression PCR peuvent être appliqués individuellement lors de tout processus PCR. Appliqués à la SSH, les résultats ont démontré qu'ils constituent des améliorations très intéressantes.

## DESCRIPTION DE L'INVENTION

**Matériel Végétal.** Différentes variétés de blé (*Triticum aestivum* L.) ont été utilisées pour leur réponse à l'aluminium et leur patrimoine génétique dont Atlas-66 qui tolère le métal et Fundy qui est sensible au métal. Les graines de ces variétés ont été mises à germer sous lumière continue pendant 4 jours dans la vermiculite. Les plantules ainsi obtenues ont été exposées à différentes concentrations d'aluminium (5 ou 50  $\mu$ M) dans des solutions de chlorure de calcium de 1 mM à pH4,15 pendant 17 heures. Les 5 premiers millimètres de chacune des racines des grains ont été prélevés puis congelés à  $-80^{\circ}\text{C}$ . Les ARN totaux ont par la suite été extraits de ces échantillons et ont servi à obtenir des ARN poly A<sup>+</sup>. Les ARN poly A<sup>+</sup> d'Atlas-66 exposé à 50  $\mu$ M d'Al ont été utilisés comme *tester* et ceux de Fundy exposé à 5  $\mu$ M ont été utilisés comme *driver*.

**Extraction et Quantification des ARN.** Les ARN ont été extraits à l'aide du TRIzol Reagent d'INVITROGEN avec l'étape optionnelle de la centrifugation après broyage du matériel biologique. Les ARN étaient par la suite traités sans attente à la DNase de PROMEGA : 5 u RQ1, 10 mM Dithiothréitol, 45 u RNA Guard (AMERSHAM BIOSCEINCES), 20 min à 37°C. Un volume de chloroforme était ensuite ajouté et après centrifugation, la phase aqueuse contenant les ARN était précipitée avec 1/10 de volume d'Acétate de Sodium 3 M pH5,5 et 2,5 volume d'Isopropanol froid. Les tubes étaient centrifugés pendant 15 min à 16 300 g. Les culots furent lavés avec 500  $\mu$ l d'éthanol 70% froid puis centrifugés 5 min à 16 300 g. Les culots étaient ensuite séchés et resuspendus dans 200  $\mu$ l d'eau. Les ARN ont été quantifiés par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 260 nm.

**Chromatographie d'ARN poly A<sup>+</sup>.** Le protocole de chromatographie d'ARN poly A<sup>+</sup> utilise le principe de colonne d'oligo-dT. Les colonnes sont réalisées à partir de 10 mg d'oligo-dT type 7 de PHARMACIA

BIOTECH transférés grâce à des volumes de NaOH 0,1 M dans un support avec filtre. Les support des colonnes sont ensuite placés dans des tubes ependorfs de 1,5 ml. Les colonnes d'oligo-dT ainsi obtenues sont resuspendues avec 500 µl de NaOH 0,1 M puis centrifugées 5 min à 16 300 g. Les filtrats ne sont pas conservés. Ce lavage à la soude est répété 2 fois. De la même façon suivent 3 lavages avec 500 µl d'eau et 3 lavages avec 500 µl de *Loading Buffer* 1X (Tris-HCl pH8,8 20 mM ; NaCl 0,5 M ; Sodium N-Lauryl Sarcosinate 0,1 %). Les ARN dissous dans l'eau sont chauffés 10 min à 65°C et placés ensuite dans la glace. Un volume de *Loading Buffer* 2X est ajouté aux ARN afin d'obtenir une solution à 1X d'environ 500 µg/ml. La solution d'ARN 1X ainsi obtenue est appliquée par volume de 500 µl sur la colonne d'oligo-dT en centrifugeant à chaque fois à 350 g pendant 10 à 30 min. Les éluats obtenus ne sont pas conservés. Suivent 4 lavages avec 500 µl de *Loading Buffer* 1X sous 350 g pendant 10 à 30 min. Les ARN poly A<sup>+</sup> sont élués par 3 lavages de 500 µl de *Elution Buffer* (Tris-HCl pH8,8 10 mM ; EDTA 1 mM ; SDS 0,05%) préchauffés à 65°C et centrifugés à 16 300 g pendant 1 min. Les 3 filtrats ainsi obtenus sont réunis dans un tube de 15 ml, 150 µl d'acétate de sodium 3 M, pH5,5 et 4 ml d'isopropanol froid y sont ajoutés. Les tubes sont placés 1 heure à -20°C puis centrifugés 30 min à 6 000 g. Les culots sont lavés avec 4 ml d'éthanol 70% sous 6 000 g durant 30 min, séchés et resuspendus dans 200 µl d'eau. Les ARN poly A<sup>+</sup> sont quantifiés de la même façon que précédemment par spectrophotométrie.

**SSH : Synthèse du premier brin d'ADNc.** La majorité des étapes SSH1 ont été réalisées selon le kit PCR-Select cDNA Subtraction de CLONTECH mais certaines modifications ont été apportées et sont décrites dans les paragraphes suivants. A 2 µg d'ARN poly A<sup>-</sup> sont ajoutés 10 pmol de *cDNA Synthesis Primer* (oligo-dT possédant un site de restriction *Hind* III, un site de restriction *Rsa* I et 2 bases aléatoires ; tableau 1). L'ensemble est incubé 2 min à +70°C. Les tubes sont ensuite refroidis 2 min dans la glace. Sont additionnés du *First-Strand Buffer* (Tris-HCl pH8,5 50 mM ; MgCl<sub>2</sub> 8 mM ; KCl 30 mM ; DTT 1mM), des dNTP à une concentration finale de 1 mM et 20 unités de Reverse Transcriptase d'Avian Myeloblastosis Virus (AMV). Après être agités, les tubes sont incubés 1,5 heures à 42°C. Les réactions sont arrêtées en plaçant les tubes dans la glace et la synthèse du deuxième brin d'ADNc est aussitôt réalisée.

**SSH : Synthèse du deuxième brin d'ADNc.** Aux tubes précédents sont ajoutés du *Second-Strand Buffer* (KCl 100 mM ; ammonium sulfate 10 mM ; MgCl<sub>2</sub> 5 mM ; β-NAD 0,15 mM ; Tris-HCl pH7,5 20 mM ; BSA 0,05 mg/ml), des dNTP à 0,2 mM final et du *Second-Strand Enzyme Cocktail* (DNA polymérase I 24 unités ; RNase H 1 unité ; *E. coli* DNA ligase 4,8 unités). Les tubes sont agités et incubés 2 heures à 16°C. Six unités de T4 DNA Polymerase sont ajoutées aux tubes et l'ensemble est agité puis placé 30 min à 16°C. Cette deuxième étape de synthèse est terminée par l'ajout de 4 µl de 20X *EDTA/Glycogen Mix* (EDTA 200 mM ; glycogène 1 mg/ml). Cinquante microlitres de phénol Tris saturé pH7,5 et 50 µl de chloroforme sont ajoutés. Les tubes sont agités au vortex et centrifugés à 16 300 g pendant 10 min à température ambiante. Les phases aqueuses sont prélevées et 100 µl de chloroforme y sont ajoutés. Les tubes sont de nouveau agités et une nouvelle centrifugation à 16 300 g est effectuée. Les phases aqueuses sont de nouveau prélevées. Après l'ajout de 40 µl d'acétate d'ammonium 3 M et 300 µl d'éthanol 95%, les tubes sont directement centrifugés 20 min à 16 300 g à température ambiante. Les culots sont ensuite lavés avec 500 µl d'éthanol 70%. Les tubes sont de nouveau centrifugés 10 min à 16 300 g. Les culots sont laissés 10 min à l'air de la pièce pour évaporer l'éthanol. Ils sont resuspendus dans 50 µl d'eau. Six microlitres sont prélevés et conservés à -20°C pour être observés par électrophorèse.

**SSH : Traitements des ADNc double-brins.** Les ADNc de Fundy (*driver*) ont suivi les conditions suivantes où l'enzyme *Rsa* I et le tampon enzymatique ont été remplacés par de l'eau lors du protocole SSH avec Suppression PCR par Remplissage des Extrémités. Les ADNc double-brins sont digérés avec 15 unités de *Rsa* I dans du tampon *Rsa* I Restriction Buffer (Bis Tris Propane-HCl pH7 10 mM ; MgCl<sub>2</sub> 10



mM ; D'IT 0,1 mM) 1,5 heures à 37°C. Cinq microlitres sont conservés pour estimer l'efficacité de la digestion, la réaction est terminée par l'ajout de 2,5 µl 20X *EDTA/Glycogen Mix*. Vingt-cinq microlitres de phénol et 25 µl de chloroforme sont ajoutés aux réactions et après agitation les tubes sont centrifugés 10 min 16 300 g. La phase aqueuse est prélevée, 50 µl de chloroforme sont ajoutés et l'ensemble est agité. Une nouvelle centrifugation à 16 300 g durant 10 min est effectuée, la phase aqueuse est de nouveau prélevée. Les ADN sont précipités à l'aide de 25 µl d'acétate d'ammonium 3 M et 187,5 µl d'éthanol 95 % sous 16 300 g pendant 20 minutes. Les culots sont lavés avec 200 µl d'éthanol 70 %, centrifugés à 16 300 g durant 5 minutes, puis séchés à l'air libre 10 minutes et resuspendus avec 5,5 µl d'eau. Les tubes sont conservés à -20°C.

**SSH : Ligation des adaptateurs aux fragments d'ADNc tester digérés.** Un microlitre d'ADNc double-brins *tester* digérés par *Rsa I* est dilué avec 5 µl d'eau stérile. De cette dilution, 4 µl vont être prélevés pour effectuer la ligation selon les conditions du fournisseur CLONTECH. Les tubes sont incubés à 16°C toute la nuit. La réaction est arrêtée en ajoutant 1 µl de 20X *EDTA/Glycogen Mix* et en chauffant 5 minutes à 72°C. Les tubes sont conservés à -20°C.

**SSH : Première hybridation *tester/driver* pour chaque série d'adaptateur.** La première hybridation *tester / driver* a été réalisée selon les conditions du fournisseur CLONTECH.

**SSH : Mélange des *testers* et deuxième hybridation contre le *driver*.** A 1 µl ADNc db *driver* non-digérés par l'enzyme *Rsa I*, 1 µl de 4X *Hybridization Buffer* et 2 µl d'eau sont ajoutés. Les ADNc du *driver* sont dénaturés 1,5 minutes à 98°C. Les tubes de *tester* précédents et ces nouveaux ADNc *driver* fraîchement dénaturés sont alors réunis et mis à incuber à 68°C toute la nuit. Cent microlitres de *Dilution Buffer* (HEPES-HCl pH8,3 20 mM, NaCl 50 mM, EDTA pH8 200 µM) à température ambiante sont ensuite ajoutés. Les tubes sont incubés 7 minutes à 68°C puis conservés à -20°C.

**SSH : Remplissage des Extrémités et amplification PCR.** Un microlitre de produit de deuxième hybridation est utilisé pour réaliser une PCR dans un volume finale de 25 µl selon les concentrations finales *PCR primer 1* 0,4 µM, dNTP 0,2 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, Native Taq DNA polymérase 2,5 u, 1X PCR Reaction Buffer (INVITROGEN). Initialement l'étape de *Filling the ends* 5 min à 72°C puis la PCR est réalisée selon les cycles PCR : 25 sec 95°C ; (30 sec 95°C, 30 sec 60°C, 90 sec 72°C)<sub>28</sub>.

**SSH : Amplification *Nested-PCR*.** Un microlitre des produits dilués de la première PCR est utilisé pour l'étape de *Nested-PCR*. Les conditions de *Nested-PCR* selon le protocole standard ont été réalisées selon celles du kit de CLONTECH. Les conditions de *Nested-PCR* sans Ajout d'ARN ont été les suivantes pour un volume de 25 µl : *Nested-PCR Primer 1* 0,4 µM, *Nested-PCR Primer 2* 0,4 µM, dNTP 0,2 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, Native Taq DNA polymérase 2,5 u, 1X PCR Reaction Buffer (INVITROGEN) selon les cycles 30 sec 95°C ; (30 sec 95°C, 30 sec 68°C, 90 sec 72°C)<sub>30</sub>. Les conditions de *Nested-PCR* avec Ajout d'ARN ont été les suivantes pour un volume de 25 µl : *Nested-PCR Primer 1* 0,4 µM, *Nested-PCR Primer 2* 0,4 µM, dNTP 0,2 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, Native Taq DNA polymérase 2,5 u, 1X PCR Reaction Buffer (INVITROGEN) et 10 µg d'ARN totaux du *driver* selon les cycles 30 sec 95°C ; (30 sec 95°C, 30 sec 68°C, 90 sec 72°C)<sub>30</sub>.

**Colonic blot.** Le criblage s'est fait par hybridation sur colonie selon un protocole dérivé de celui de Grunstein et Hogness (1975) avec des ADNc. Les ADNc utilisés sont issus de la transcription inverse d'ARN totaux de *driver* et de *tester* traités à la RQI par le Kit Reverse Transcription System de PROMEGA. Cette source d'ADNc représentait en majorité les gènes très ou moyennement abondants. Le marquage au <sup>32</sup>P des ADNc et les tests de northern blot réalisés sur les clones retenus ont été procédés selon le protocole décrit par Houde et al, 1992 .



**Analyse des produits SSH.** Les profils des différents amplifiats de *Nested-PCR* des banques SSH ont été analysés sur gel d'agarose pour 3 gènes exprimés de façon différente : Oxo, 48E8 et 49A1. Des conditions PCR standard ont été utilisées avec les cycles suivants : 5 min 95°C ; (30 sec 95°C, 30 sec 60°C, 90 sec 72°C)<sub>5</sub> ; (30 sec 95°C, 120 sec 72°C)<sub>35</sub> ; 5 min 72°C. Les séquences des amorces utilisées et les tailles théoriques attendues sont mentionnées dans le **Tableau 1**.

**RT-PCR du gène 49A1.** Pour réaliser les études *Real-Time* PCR, la quantité des ARN a été estimée à l'aide du RiboGreen Kit (MOLECULAR PROBE) selon les conditions du fournisseur. Les transcriptions inverses ont été effectuées à l'aide du kit Reverse Transcription System de PROMEGA. L'analyse de l'expression du gène 49A1 par *Real-Time* PCR (ABI Prism 7000 Sequence Detection System) s'est faite à l'aide du kit Sybr Green PCR Master Mix (APPLIED BIOSYSTEMS). L'expression du gène de la GA<sub>3</sub>PDH cytosolique a servi de référence. Cette enzyme appartient au métabolisme de base et le niveau d'expression de son ARNm a été utilisé comme contrôle interne. Cinquante nanogrammes d'ADNc ont été utilisés pour chaque condition selon les cycles suivants de PCR : 2 min 50°C, 10 min 95°C (20sec 95°C, 60 sec 60°C)<sub>45</sub>. Les amorces ont été déterminées à l'aide du logiciel Primer Express® v2.0 (APPLIED BIOSYSTEMS). Leurs séquences et la taille des amplifiats attendus sont décrits dans le **Tableau 1**. Deux séries d'expériences RT-PCR ont été réalisées : la première ayant conduit à la lecture de 2 mesures, la deuxième à la lecture de 4 mesures. Les expressions sont évaluées par la différence du numéro de cycle pour une ligne de base de 0,8 entre les gènes 49A1 et GA<sub>3</sub>PDH pour les conditions 0 µM, puis 5 µM ou 50 µM d'aluminium selon les variétés (5 µM pour Fundy et 50 µM pour Atlas-66) (**figure 9A**). Une ligne de base de 0,8 a été choisie à la suite de tests de proportionnalité à partir de plasmide (résultats non montrés). Les valeurs pour 0 µM d'aluminium ont servi par la suite de référence pour estimer les expressions à 5 µM ou 50 µM (**figure 9B**).

## RÉSULTATS

**Colonic blot.** Les premières expériences de SSH réalisées au laboratoire selon le protocole standard (**figure 1**) visaient à rechercher des gènes de tolérance à l'aluminium chez le blé tolérant Atlas-66. Les ADNc de la variété tolérante Atlas-66 exposée à 50 µM d'Al ont été utilisés comme *tester* et ceux de la variété sensible Fundy exposée à 5 µM ont été utilisés comme *driver*. A ces concentrations d'Al les 2 variétés présentent des inhibitions de croissance racinaire similaires et des taux d'induction identiques pour de nombreux gènes de stress (Hamel et al, 1998). Les premières expériences ont été peu concluantes surtout par la présence massive (96%) de gènes communs abondants confirmée par colonie blot (**figure 6A**). Le procédé de Suppression PCR avec Ajout d'ARN a alors été appliqué au protocole SSH standard. L'analyse de colonie blot (**figure 6B**) montrait une diminution des gènes très abondants pour une augmentation des gènes moyennement abondants et peu abondants (ces derniers passant de 4 à 14 %). Ces résultats venaient confirmer l'hypothèse selon laquelle la SSH présentait des faiblesses de soustraction. Le séquençage d'une centaine de clones présentant des faibles signaux en colonie blot a permis de mettre en évidence que 70% de ces clones codaient pour des ARN ribosomiques mitochondriaux, gènes communs aux populations de *tester* et de *driver* et qui auraient dû être soustraits. Desai et al (2000), les auteurs de la SSH précise que la basse qualité des banques SSH résulte de 3 facteurs : (i) la qualité des ARN de départ, (ii) le rendement de la soustraction et (iii) surtout du choix des populations de *tester* et *driver*. La forte présence d'ARN ribosomiques mitochondriaux suggérait un faible enrichissement des ARN poly A<sup>+</sup> en ARNm et une importante contamination en ARN ribosomiques. De nouvelles expériences SSH ont été réalisées avec des populations d'ARN poly A<sup>+</sup> très appauvries en ARNr. La **figure 6** montre les profils de

colonie blot obtenus avec ces nouveaux ARN selon le protocole standard et selon les protocoles améliorés avec les Suppression PCR par Remplissage des extrémités et Ajout d'ARN. Une forte réduction du nombre de colonies détectées par hybridation avec des ADNc du *driver* est obtenue en utilisant de l'ARN enrichi en polyA<sup>+</sup> comme matériel de départ pour construire les banques SSH. La méthode SSH standard présente encore 10-15% de clones codant pour des gènes abondants (**figure 6C**). Par contre, une absence totale de gènes abondants est observée lorsque la SSH est réalisée avec la Suppression PCR par Remplissage des Extrémités seule (**figure 6D**) ou en combinaison avec la Suppression PCR ajout d'ARN (résultats non montrés). L'analyse en colonie blot confirme donc que les nouveaux procédés de Suppression PCR apporte une amélioration tangible à la SSH en terme de représentativité des gènes.

**Nested PCR SSH.** Les profils des produits nested PCR obtenus en fin de SSH confirment là encore des améliorations de la qualité des banques construites (**figure 7A**). Les produits obtenus après PCR Suppression par Remplissages des Extrémités et Ajout d'ARN ne présentent pas de bandes dominantes (piste 4 et 5 **figure 7A**) à l'inverse des produits nested PCR du protocole SSH standard (piste 2 **figure 7A**). CLONTECH, dans leur kit PCR-Select™ cDNA Subtraction précise que les bandes majeures généralement observées dans les produits de SSH représentent des gènes non-différentiellement exprimés et recommande aux utilisateurs de ne pas chercher à les cloner. Ces bandes représenteraient donc des gènes faux-positifs. Ainsi l'absence de bandes majeures dans les produits PCR et la présence de multiples bandes très fines (piste 4 et 5) prouveraient une meilleure qualité des banques construites avec les nouveaux procédés de PCR Suppression. Il est à noter la présence du front d'ARN dans la piste 5 due au protocole de PCR Suppression avec Ajout d'ARN.

**Tests PCR.** La qualité des produits SSH a aussi été estimée par des tests PCR sur des gènes dont les profils d'expression entre le *tester* et le *driver* sont connus. Trois gènes avec des profils d'expression différents ont été détectés : (i) Oxo, un gène de stress moyennement abondant induit de façon similaire chez le *tester* et le *driver* (Oxalate oxydase cf. **Hamel et al. 1998**), (ii) 48E8, un gène rare exprimé de façon similaire chez les deux variétés (48E8, isolé au cours de ces travaux), (iii) et 49A1, un gène rare surexprimé d'un facteur 2 à 4 chez le *tester* comparativement au *driver*. Les gènes Oxo et 48E8 ont été soustraits aussi bien dans les protocoles standard (piste 2 **figure 7B**) que dans les protocoles améliorés (piste 4 et 5 **figure 7B**). Le gène 48E8 étant un gène rare, l'efficacité de soustraction semble identique entre les différents protocoles. Cependant, un fort enrichissement du gène d'intérêt 49A1 est observé dans les produits utilisant les procédés de Suppression PCR par Remplissage des Extrémités (piste 4 **figure 7B**) et un enrichissement plus modérés lorsque les techniques de PCR Suppression par Remplissage des Extrémités et Ajout d'ARN sont combinées (piste 5 **figure 7B**). Pour le protocole standard, une très faible présence du gène est observée. La représentativité des gènes n'est donc pas la même entre les populations nested-PCR SSH. Une des raisons pourrait être la variabilité des cycles PCR. Les PCR et nested PCR ont donc été ré-effectuées plusieurs fois et des profils d'amplifiats strictement identiques ont été observés (résultats non montrés). La faible présence du gènes 49A1 dans la banque SSH standard pourrait s'expliquer par une dérive de la PCR qui amplifierait plus facilement des fragments indésirables (les bandes majeures) que des fragments d'intérêt (49A1).

**Analyse de séquences.** L'analyse des séquences de 289 clones obtenus selon le protocole SSH avec Suppression PCR par Remplissage des Extrémités et de 72 clones obtenus par SSH avec Suppression PCR par Remplissage des Extrémités et Ajout d'ARN montre une faible présence de gènes constitutifs généralement considérés comme des faux-positifs (*background*) (**figure 8 ; tableaux 2 et 3**). Environ 15% de gènes constitutifs sont isolés en utilisant le protocole SSH avec Suppression PCR par Remplissage des Extrémités (**tableau 2**) contre 6% seulement en combinant ce protocole avec l'ajout d'ARN (**tableau 3**). Ces chiffres représentent une réelle efficacité des nouveaux protocoles de Suppression PCR puisque dans des précédentes expériences de SSH réalisées au laboratoire selon le protocole standard, la proportion de ces clones faux-positifs représentant des gènes fortement exprimés pouvait dépasser les 90%. La très forte présence de gènes inconnus (49 à 65%) met en évidence une normalisation importante. L'analyse dans les

banques de données d'EST a confirmé que tous ces gènes étaient issus du blé et non d'une contamination éventuelle. Un certain nombre de gènes connus sont représentés par plusieurs clones dans les banques obtenues suivant les deux protocoles améliorés (tableaux 2 et 3). Les analyses northern ont révélé que ces gènes ne sont pas plus exprimés dans la population *tester* que dans la population *driver* (non montré) suggérant que ces gènes n'ont pas été entièrement soustraits. L'analyse de plusieurs gènes représentés par un seul clone unique dans les banques a révélé qu'une faible partie d'entre eux étaient détectables par northern blot et que des expériences de RT-PCR étaient nécessaires pour évaluer leur taux d'expression chez le *tester* et le *driver*. Les nouveaux procédés SSH permettent donc d'isoler des gènes très faiblement représentés (gènes rares) dans les populations d'ARNm. Les résultats de northern blot et RT-PCR ont montré que la majorité de ces gènes rares ne présentaient pas de différence d'expression entre les ARNm de tester et driver (résultats non montrés). La normalisation des fragments aurait donc un impact plus grand que la soustraction. Toutefois un gène rare différenciellement exprimé a pu être isolé grâce aux nouveaux procédés de PCR Suppression, le gène 49A1. L'analyse RT-PCR a montré que chez le *driver* Fundy, l'induction par 5  $\mu$ M d'aluminium conduisait à une différence de cycle de 0,75 et 0,76 (duplicata) alors que chez le tester Atlas l'induction par 50  $\mu$ M conduisait à une différence de cycle de 1,1 et 2,71 (figure 9). Ainsi en terme d'expression entre le *tester* et le *driver* il y a 0,4 à 2,31 de cycles de différence soit un facteur d'induction de  $2^{0,4}=1,31$  et  $2^{2,31}=4,96$  selon les expériences de RT-PCR. Les nouveaux procédés de PCR Suppression ont donc permis d'isoler un gène présentant de très fines variations d'expression entre des populations d'ARNm *tester* et *driver* pourtant très proches génétiquement.

## DISCUSSION

L'Hybridation Suppressive Soustractive est une technique de biologie très utilisée pour ses capacités de suppression. Cependant cette méthodologie normalise plus qu'elle ne soustrait. Afin de pallier ce manque d'efficacité, de nouvelles stratégies de Suppression PCR ont été mises au point dans notre laboratoire. La Suppression PCR par Remplissage des Extrémités représente la plus intéressante des améliorations. Elle limite la présence de séquences d'adaptateurs sur les brins d'ADNc du *driver* et sur les extrémités 3' des brins d'ADNc de *tester* qui devraient être théoriquement soustraits. La présence à première vue anodine de ces séquences semble en fait être à l'origine de la majorité des clones faux positifs SSH. En effet, lorsque ces séquences d'adaptateurs ne peuvent pas être synthétisées sur des brins d'ADNc de *driver*, aucune bande majoritaire n'est observée sur les profils PCR SSH (piste 4 et 5 **figure 7A**) alors que cela est le cas lors de protocole Standard (piste 2 **figure 7A**). Ces bandes majeures sont reconnues par CLONTECH dans leur kit comme étant des bandes contaminantes. **Rebrikov et al (2000)** ont observé lors de leur tentative d'améliorer la SSH qu'une source en excès de *driver* conduisait à l'apparition de bandes contaminantes par amplification PCR (**Rebrikov et al, 2000 ; figure 2** piste 3 et 6). L'origine du *background* serait donc bien due aux molécules de *driver*. Techniquement, la Suppression PCR par Remplissage des Extrémités repose essentiellement sur 2 modifications : (i) dans le protocole standard SSH, l'utilisation de *driver* digéré par l'enzyme *Rsa I* permet la synthèse d'une séquence d'adaptateur aux extrémités 3' lors de l'étape de *filling* (① et ② **figure 3**), dans le protocole modifié, l'utilisation de *driver* non-digéré et d'une ADN polymérase non-correctrice (sans activité exonucléase) ne permet pas cette synthèse (① et ② **figure 5**) ; (ii) lors de l'étape de *filling* du protocole modifié, il y a synthèse en 3' des brins digérés de *tester* d'une séquence complémentaire aux brins de *driver* non-digérés (③ **figure 5**). Le fait que les ADNc *driver* ne puissent pas avoir de séquences d'adaptateur interdit leur amplification par PCR. De plus, la synthèse en 3' des brins de *tester* ayant rencontrés leur complémentaire *driver* joue un rôle de Suppression très élevé puisque ces brins ne pourront pas par la suite être amplifiés : ces brins *tester* sont définitivement écartés des PCR. L'utilisation d'une polymérase sans activité exonucléase joue un rôle très important : cette absence d'activité garanti le non remplacement des séquences flottantes de *driver* par des séquences d'adaptateurs (② **figure 5**). De la même façon, c'est cette même enzyme qui garantit la Suppression irréversible d'un fragment de *tester* ayant rencontré son complémentaire *driver* par l'incapacité de corriger les extrémités flottantes (④ **figure 5**). Reste le problème du *background* due aux molécules "a" (⑤ **figure 3 et 5**). Il devrait être minime car il ne résulte que des brins de *tester* n'ayant pu trouver au gré du hasard leurs brins complémentaires de *driver* malgré la mise en excès de ce dernier (⑤ **figure 3 et 5**). A chaque cycle PCR ces molécules ont une très faible probabilité de rencontrer une molécule de *tester* complémentaire mais une très forte probabilité de rencontrer une molécule de *driver* complémentaire. Une fois qu'une molécule de type "a" du *tester* a rencontré une molécule de *driver*, elle se comporte alors comme une molécule du type "c". Comme cela est expliqué plus haut, ces nouvelles molécules "c" ne pourront être amplifiées par le procédé de PCR Suppression par Remplissage des Extrémités (①,②,③ et ④ **figure 5**) alors qu'elles conduisent à l'amplification de molécule de *driver* lors de protocole standard SSH (①,②,③ et ④ **figure 3**). Si par contre 2 molécules *tester* complémentaires de type "a" se rencontrent, une amplification indésirable a lieu et ne peut être empêché par la Suppression PCR par Remplissage des Extrémités (⑤ **figure 5**).

Afin d'essayer tout de même d'éliminer le *background* due aux molécules "a", le procédé de Suppression PCR avec Ajout d'ARN a été appliqué à la SSH (**figure 4B**). Durant cette nouvelle modification apportée à la SSH, un excès d'ARN de *driver* est ajouté aux réactions PCR. Lors des cycles PCR, après les étapes de dénaturation, des hétéroduplex ADN/ARN se forment. Sur les profils PCR SSH, aucune différence significative n'est observable entre les conditions avec et sans PCR Suppression par ajout d'ARN (piste 5 et 4 respectivement, **figure 7A**). Aucune bande majoritaire ne sont présentes. Cependant, un ralentissement ou une inhibition des amplifications des brins d'ADN de *tester* trouvant leurs complémentaires chez la population d'ARN *driver* sont tout de même observés. En effet, le gène 49A1 présent à la fois chez le *tester* Atlas 50  $\mu\text{M}$  et de façon moindre (2 à 5 fois moins) chez le *driver* Fundy 5  $\mu\text{M}$  présente une amplification diminuée par l'ajout d'ARN (piste 5 versus piste 4 **figure 7B**).

Ainsi, l'amplification accidentelle des molécules de types "a" est réduite par l'application du procédé de Suppression PCR avec Ajout d'ARN à celui de Remplissage des Extrémités lors de SSH. Cependant cette Suppression PCR n'est pas irréversible car elle est basée uniquement sur des probabilités d'hybridation. Le gène 49A1 par exemple n'est pas totalement supprimé (piste 5 **figure 7B**). Ceci peut s'expliquer par le fait que 49A1 est un gène rare donc avec une faible probabilité d'hybridation ADNc/ARN. De plus ce gène est plus présent chez le tester que chez le driver : même si l'ARN de driver est mis en excès, il n'y en a peut être pas suffisamment pour former le nombre de complexes requis. Quoiqu'il en soit, cette nouvelle amélioration permet d'augmenter la qualité des banques SSH obtenues en limitant l'amplification des molécules de type "a".

L'efficacité de normalisation de la SSH a été augmentée : avec le protocole standard de SSH, la proportion des clones faux-positifs représentant des gènes fortement exprimés pouvait dépasser les 90% (**figure 6A**), en utilisant le protocole SSH avec Suppression PCR par Remplissage des Extrémités seulement 15% des clones isolés codent pour des gènes constitutifs (**tableau 2**) et ce nombre tombe à 6% en combinant ce protocole amélioré SSH avec l'Ajout d'ARN (**tableau 3**). La très forte présence de gènes inconnus (49 à 65%) conforte cette idée d'augmentation de l'efficacité de normalisation et la possibilité de trouver de nouveaux gènes dans la réalisation de banques de gènes SSH.

Un gène différentiellement exprimé a pu être isolé grâce aux nouveaux procédés PCR Suppression : le gène 49A1. Les études RT-PCR ont montré que ce gène présentait des taux d'induction chez le *tester* de l'ordre d'un facteur 2 à 5 comparativement au *driver*. Les nouveaux procédés de PCR Suppression sont donc capables d'isoler des gènes présentant de très fines variations d'expression. Le fait de n'avoir trouvé qu'un seul gène différentiellement exprimé peut s'expliquer par l'utilisation de populations tester et driver très proches génétiquement. En effet **Hamel et al (1998)** ont mis en évidence qu'à 5  $\mu$ M et 50  $\mu$ M d'aluminium respectivement les plantes sensibles et tolérantes exprimaient de nombreux gènes de stress à des taux identiques et se situaient dans des états physiologiques similaires. Le fait que le tester et le driver présentent des populations d'ARNm très semblables favoriserait au niveau la représentation des faux-positifs dus aux molécules de types "a" : vu qu'il n'y a que peu de gènes différentiellement exprimés, les artefacts des molécules "a" vont se retrouver sur-représentés. Cette proportion de dérives des molécules de type "a" devraient être très faible dans les expériences de SSH avec des populations driver et tester éloignées génétiquement.

De nouvelles améliorations peuvent encore être envisagées. En effet il serait possible d'appliquer aux nouveaux procédés de PCR Suppression décrits ici les procédés de biotinylation de **Kiss et al (2003)** ou encore celui de Mirror Orientation Selection (MOS) avec des adaptateurs différents de **Rebrikov et al (2000)**. Il serait donc possible d'obtenir des banques SSH d'une qualité encore accrue. Cependant la PCR Suppression par Remplissage des Extrémités semble présenter des capacités de suppression bien supérieures aux améliorations de ces auteurs.

En somme, les nouveaux procédés de PCR Suppression décrits ici démontrent des améliorations de normalisation et de suppression lorsqu'ils sont appliqués à la technique de SSH. Le fait d'enrichir en gènes inconnus les banques SSH représente un très grand intérêt surtout dans les constructions de banques de gènes. Les nouveaux procédés de Suppression PCR devraient permettre de construire des banques ayant de grande chance de représenter tous les gènes exprimés dans une cellule à un état physiologique donné. La SSH selon le protocole standard est très utilisée actuellement pour la construction de banques de gènes par son effet de normalisation (banque pour DNA chips), pour l'isolement de région unique de génome et la recherche de gènes différentiellement exprimés par son effet de soustraction. Ainsi, une augmentation accrue de son efficacité augmente les chances de construire des banques de meilleure qualité et de découvrir de nouveaux gènes d'intérêts.

## RÉFÉRENCES

- Brenner S., Johnson M., Bridgham J., Golda G., Lloyd D.H., Johnson D., Luo S., McCurdy S., Foy M., Ewan M., Roth R., George D., Eletr S., Albrecht G., Vermaas E., Williams S.R., Moon K., Burcham T., Pallas M., DuBridge R.B., Kirchner J., Fearon K., Mao J. and Corcoran K. (2000).** Gene expression analysis by massively parallel signature sequencing (MPSS) on microbead arrays. *Nat Biotechnol* **18** : 630-634
- Diatchenko L., Lau Y-F. C., Campbell A.P., Chenchik A., Moqadam F., Huang B., Lukyanov S., Lukyanov K., Gurskaya N., Sverdlov E. and Siebert P. D. (1996).** Suppression subtractive hybridization : a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93** : 6025-6030.
- Diatchenko L., Chenchik, A. and Siebert, P. D. (1998)** in *Gene Cloning and Analysis by RT-PCR*, eds. Siebert, P.D. & Larrick J.W. (Natick, MA), pages : 213-237.
- Desai S., Hill J., Trelogan S., Diatchenko L. and Siebert P.D. (2000)** in *Functional Genomics*, eds. Hunt, S.P. & Livesey F.J. (Oxford University Press), pages : 105-112.
- Dwyer K.G., Lamonica J.M., Schumacher J.A., Williams L.E., Bishara J., Lewandowski A., Redkar R., Patra G., DelVecchio V.G. (2004).** Identification of *Bacillus anthracis* specific chromosomal sequences by suppressive subtractive hybridization. *BMC Genomics* **5** : 15-26.
- Grunstein M. and Hogness D. (1975).** Colony hybridization : a method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72** : 3961-3965.
- Hamel F., Breton C. and Houde M. (1998).** Isolation and characterization of wheat aluminum-regulated genes : possible involvement of aluminum as a pathogenesis response elicitor. *Planta* **205** : 531-538.
- Hanazawa M., Mochii M., Ueno N., Kohara Y. and Iino Y. (2001).** Use of cDNA subtraction and RNA interference screens in combination reveals genes required for germ-line development in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci USA* **98** : 8686-8691.
- Houde M., Danyluk J. and Sarhan F. (1992).** A molecular marker to select for freezing tolerance in graminac. *Mol. Gen. Genet.* **234** : 43-48
- Kang D.C., LaFrance R., Su Z.Z. and Fisher P.B. (1998).** Reciprocal subtraction differential RNA display: an efficient and rapid procedure for isolating differentially expressed gene sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95** : 13788-13793.
- Kiss C., Nishikawa J., Dieckmann A., Takada K., Klein G. and Szekely L. (2003).** Improved subtractive suppression hybridization combined with high density cDNA array screening identifies differentially expressed viral and cellular genes. *J Virol Methods* **107** : 195-203
- Liang P. and Pardee A.B. (1992).** Differential Display of eucaryotic mRNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* **257** : 967-971.
- Rebrikov D.V., Britanova O.V., Gurskaya N.G., Lukyanov K.A., Tarabykin V.S. and Lukyanov S.A. (2000).** Mirror orientation selection (MOS): a method for eliminating false positive clones from libraries generated by suppression subtractive hybridization. *Nucleic Acids Res.* **28** : E90
- Déclaration d'invention**



**Schena M., Shalon D., Davis R.W. and Brown P.O. (1995).** Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* **270** : 467-470.

**Velculescu V.E., Zhang L., Vogelstein B. and Kinzler K.W. (1995).** Serial analysis of gene expression. *Science* **270** : 484-487.

**Yang G.P., Ross D.T., Kuang W.W., Brown P.O. and Weigel R.J. (1999).** Combining SSH and cDNA microarrays for rapid identification of differentially expressed genes. *Nucleic Acids Res.* **27** : 1517-1523

**Tableau 1 : Séquences des amorces et adaptateurs.**

| Nom de l'amorce             | Séquence                                                                                                                              | Taille |
|-----------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| <i>cDNA synthesis</i>       | 5' <i>Rsa I</i> <i>Hind III</i><br>TTTTGTACAAGCTI <sub>30</sub> N <sub>1</sub> N 3'                                                   |        |
| Adaptateur 1                | 5' PCR primer 1 <i>Nested PCR primer 1</i><br>CTAATACGACTCACTATAGGGCTCGAGCGGCCCGCCGGGCAGGT 3'<br>3' GGCCCGTCCA 5'<br><i>1/2 Rsa I</i> |        |
| Adaptateur 2R               | 5' PCR primer 1 <i>Nested PCR primer 2R</i><br>CTAATACGACTCACTATAGGGCAGCGTGGTCGCGGCCGAGGT 3'<br>3' GCCGGTCCA 5'<br><i>1/2 Rsa I</i>   |        |
| PCR primer 1                | 5' CTAATACGACTCACTATAGGGC 3'                                                                                                          |        |
| <i>Nested PCR Primer 1</i>  | 5' TCGAGCGGCCCGCCGGGCAGGT 3'                                                                                                          |        |
| <i>Nested PCR Primer 2R</i> | 5' AGCGTGGTCGCGGCCGAGGT 3'                                                                                                            |        |
| OXO UNI                     | 5' CCTCCTTGTTTCTCCTCGCCGTGCTTCT 3'                                                                                                    |        |
| OXO REV                     | 5' CAGCTGCTGGCTTGTCATGCGCTAGATTCT 3'                                                                                                  | 501 pb |
| 48E8 LONG UNI               | 5' ATGAACATGTGAAGAGAGCCATGAATGAGATCAATG 3'                                                                                            |        |
| 48E8 LONG REV               | 5' AIAI'CCATGACATCCTTCGAAGAGGTCCCAGG 3'                                                                                               | 247 pb |
| 49A1 LONG UNI               | 5' GAGTTCCTTCTACGACCAGCCCCGGAGTC 3'                                                                                                   |        |
| 49A1 LONG REV               | 5' CATTATCTTTTGTATCTGGACGAGCAGTAGACGAACTGC 3'                                                                                         | 245 pb |
| 49A1 RT-PCR UNI             | 5' TCGGCATGCTCGAGTTCTT 3'                                                                                                             |        |
| 49A1 RT-PCR REV             | 5' TGCCACACCCAGGCTCTT 3'                                                                                                              | 61 pb  |
| GA3PDH RT-PCR UNI           | 5' TTGAGGGTTTGATGACCACAGTI 3'                                                                                                         |        |
| GA3PDH RT-PCR REV           | 5' TCCACCTCTCCAGTCTTGTCT 3'                                                                                                           | 86 pb  |



**Tableau 2 : Répartition fonctionnelle des gènes isolés par SSH avec Suppression PCR par Remplissage des Extrémités.**

| Classification of clones according to their homology      | Number of clones |
|-----------------------------------------------------------|------------------|
| <b>METABOLISM</b>                                         | <b>56</b>        |
| Aldehyde dehydrogenase                                    | 3                |
| Aspartate aminotransferase                                | 5+1              |
| NADH dehydrogenase                                        | 2+1              |
| Cytochrome                                                | 3                |
| S-adenosylmethionine decarboxylase                        | 2                |
| S-adenosyl L-homocysteine hydrolase                       | 2                |
| Sucrose synthase                                          | 2                |
| S-adenosylmethionine synthetase                           | 2                |
| Succinate dehydrogenase (ubiquinone reductase)            | 1+1              |
| Aminolevulinate dehydratase                               | 1                |
| Pyrophosphatase-fructose-6-phosphate-1-phosphotransferase | 1                |
| Fructose-biphosphate aldolase                             | 1                |
| Mitochondrial F0 ATP synthase D chain                     | 1                |
| Carrier protein III                                       | 1                |
| Lipoxygenase                                              | 1                |
| Indole-3-glycerol phosphate lyase                         | 1                |
| Ascorbate peroxidase                                      | 1                |
| Cullin (ubiquitin ligase)                                 | 1                |
| Disulfide isomerase                                       | 1                |
| Transaldolase                                             | 1                |
| Cinnamyl-alcohol dehydrogenase                            | 1                |
| Acetyl-CoA synthase                                       | 1                |
| Alpha-keto acid dehydrogenase                             | 1                |
| Dihydrofolate reductase-thymidylate synthase              | 1+1              |
| Aldo/keto reductase                                       | 1                |
| ABC transporter                                           | 1                |
| Cathepsin B                                               | 1                |
| UDP-glucuronosyltransferase                               | 1                |
| Arabinogalactan protein                                   | 1                |
| Hexose transporter                                        | 1                |
| Beta-1,3-glucanase precursor                              | 1                |
| ATP citrate lyase                                         | 1                |
| Acetyl CoA carboxylase                                    | 1                |
| Monodehydroascorbate                                      | 1                |
|                                                           |                  |
| <b>CONSTITUTIVE</b>                                       | <b>42</b>        |
| 28S ribosomal protein                                     | 6                |
| Endomembrane protein 70                                   | 2+1              |
| 40S ribosomal protein                                     | 4                |
| Actin                                                     | 2                |
| Ubiquitin                                                 | 5                |
| 60S ribosomal protein L21                                 | 4                |

|                                |         |
|--------------------------------|---------|
| Ribosomal protein L18          | 1+1     |
| Acidic ribosomal protein P1a   | 1       |
| Ribosomal protein L31          | 1       |
| Elongation factor-1 alpha      | 1+1     |
| 60S ribosomal protein L23      | 1       |
| 60S ribosomal protein L14      | 1       |
| 60S ribosomal protein L34      | 1       |
| 60S ribosomal protein L37a     | 1       |
| 60S ribosomal protein L13      | 1       |
| 18S ribosomal protein          | 1       |
| Alpha-tubulin                  | 1       |
| Extensin                       | 1       |
| 40S ribosomal protein S15      | 1       |
| Transcription factor HBP-1a    | 1       |
|                                |         |
| STRESS                         | 16      |
| Tumor suppressor / QM protein  | 1+3     |
| HSP70                          | 5+1     |
| HSP80                          | 2       |
| Immunophilin                   | 1       |
| SMT3 protein                   | 1       |
| DNA damage repair protein      | 1       |
| Disease resistance protein I2  | 1       |
|                                |         |
| REGULATION                     | 33      |
| Response regulator             | 3       |
| GTP-binding protein            | 2       |
| RNA binding protein            | 2+7+3+1 |
| Casein kinase II alpha         | 2       |
| Proteasome regulatory ATPase   | 2       |
| Kinase regulator               | 1       |
| U2 snRNP auxiliary factor      | 1       |
| Protein kinase                 | 1+1     |
| Alpha-amylase inhibitor        | 1       |
| F-box protein                  | 1       |
| AF10 protein                   | 1       |
| Receptor protein kinase        | 1+1     |
| Amino-acid transport repressor | 1       |
| Protein phosphatase            | 1       |
|                                |         |
| UNKNOWN                        | 142     |

5+1 : 5 clones de séquences identiques + 1 clone issu d'une autre région du même gène ou issu d'un gène de fonction homologue.

## LEGENDE DES FIGURES

**Figure 1: Méthode SSH standard (Kit PCR Select™ cDNA Subtraction de CLONTECH ; U.S. Patent Nos. 5,565,340).**

**Figure 2: Méthode de "PCR Suppression" de CLONTECH (U.S. Patent No. 5,565,340).**

**Figure 3: Origine hypothétique du *background* dans la méthode SSH standard.**

**Figure 4: Nouveaux procédés de PCR Suppression.**

A : PCR Suppression par remplissage des extrémités.

B : PCR Suppression avec ajout d'ARN.

**Figure 5: Procédé de PCR Suppression par Remplissage des Extrémités appliqué à la SSH.**

**Figure 6: Colonie blot d'ADNc de *driver* sur différentes banques SSH.**

A : colonie blot d'une banque SSH réalisée selon le protocole standard de CLONTECH.

B : colonie blot d'une banque SSH avec Suppression PCR avec Ajout d'ARN.

C : colonie blot d'une banque SSH réalisée selon le protocole standard de CLONTECH.

D : colonie blot d'une banque SSH avec Suppression PCR par Remplissage des Extrémités. Un profil identique à l'image D et obtenue lorsque la Suppression PCR par Remplissage des Extrémités et Ajout d'ARN sont combinés (non-montré). Les ARN de blés Atlas-66 exposés à 50 µM d'aluminium et ceux de blés Fundy exposés à 5 µM ont été utilisés respectivement comme *tester* et *driver*.

Les ADNc du *driver* ont été utilisés comme sonde après marquage à la radioactivité.

**Figure 7 : Gels comparatifs des produits de SSH selon différentes conditions de Suppression PCR.**

A : Gels des produits SSH. Pistes 1 & 6 : marqueur de taille moléculaire ; 2 : amplifiats SSH standards (procédé CLONTECH) ;

3 : amplifiats sans les étapes de suppression ; 4 : amplifiats SSH avec le procédé de Remplissage des Extrémités ; 5 : amplifiats SSH avec le procédé de Remplissage des Extrémités et Ajout d'ARN.

B : Gels de détection par PCR de 3 gènes dans les produits SSH. Piste 1 : marqueur de taille moléculaire ; 2 : tests PCR sur les amplifiats SSH standards (procédé CLONTECH) ; 3 : tests PCR sur les amplifiats sans procédé de suppression (banque non-soustraite) ; 4 : tests PCR sur les amplifiats SSH avec le procédé de Remplissage des Extrémités ; 5 : tests PCR sur les amplifiats SSH avec le procédé de Remplissage des Extrémités et Ajout d'ARN ; 6 : contrôles positifs des tests (plasmide dilué) ; 7 : contrôles négatifs des tests (eau).

**Figure 8 : Comparaison de la répartition fonctionnelle des gènes identifiés par SSH.**

A : Répartition fonctionnelle des gènes isolés par SSH avec Suppression PCR par Remplissage des Extrémités.

B : Répartition fonctionnelle des gènes isolés par SSH avec Suppression PCR par Remplissage des Extrémités avec Ajout d'ARN.

**Figure 9 : Expression différentielle du gène 49A1 par l'aluminium.**

A : profil des courbes d'expression obtenu par Real Time PCR. La différence en nombres de cycles représentée par la valeur (b-a) traduira si le gène 49A1 est sur-exprimé ou inhibé en utilisant le taux d'expression de GA<sub>3</sub>PDH comme référence.

B1 : Real Time PCR effectuée sur 2 séries de mesures d'une première série d'échantillon d'ARN. B2 : Real Time PCR effectuée sur 4 séries de mesures d'une deuxième série d'échantillon d'ARN.

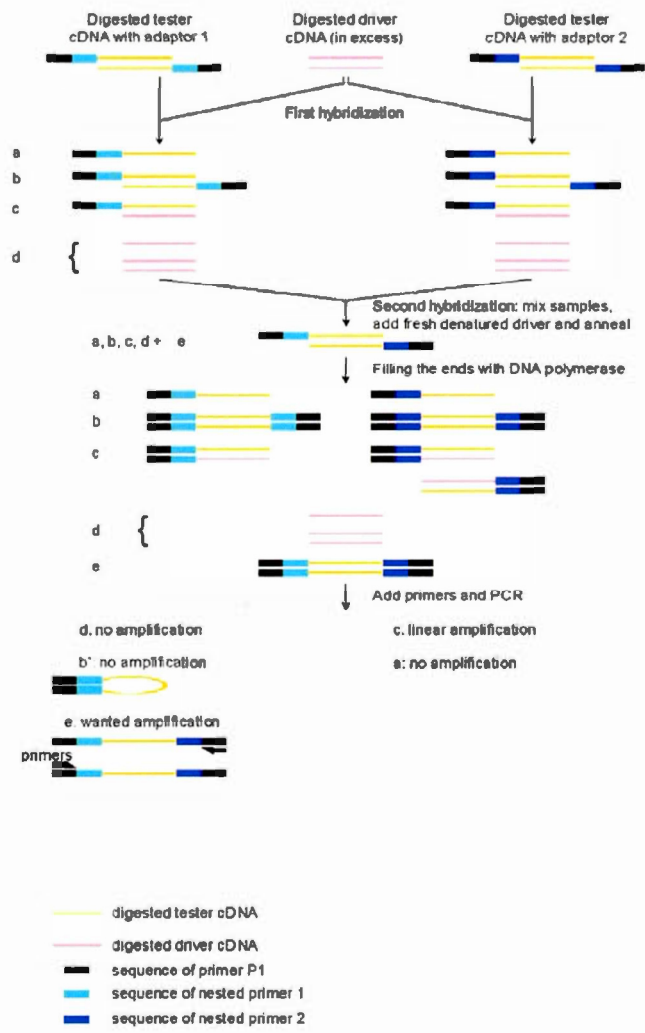


Figure 1

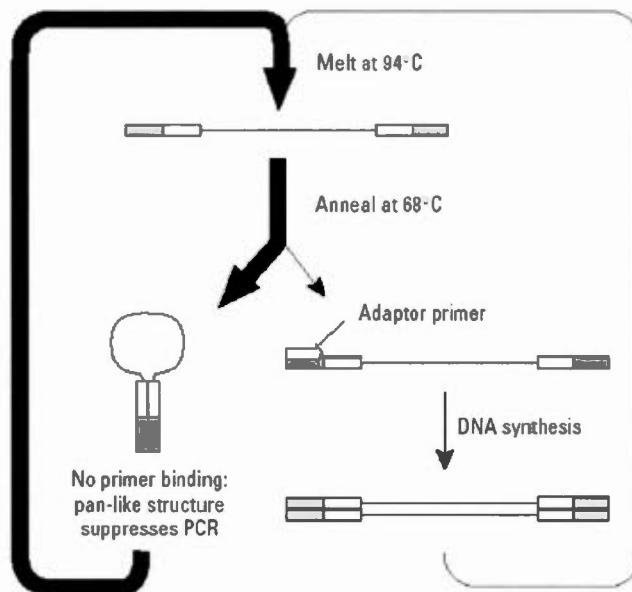


Figure 2

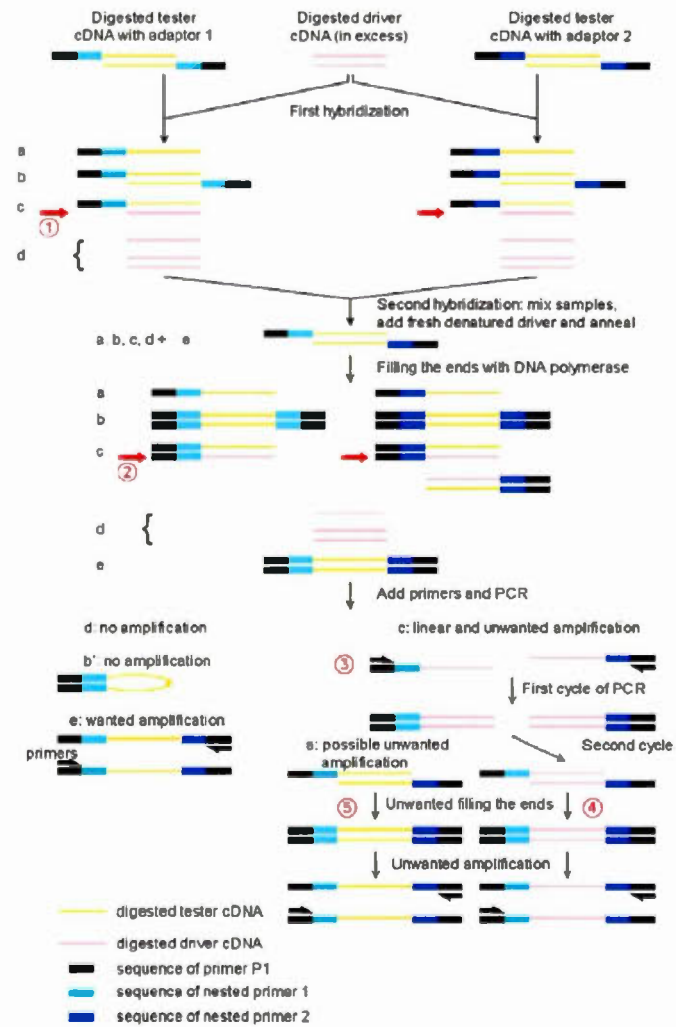


Figure 3

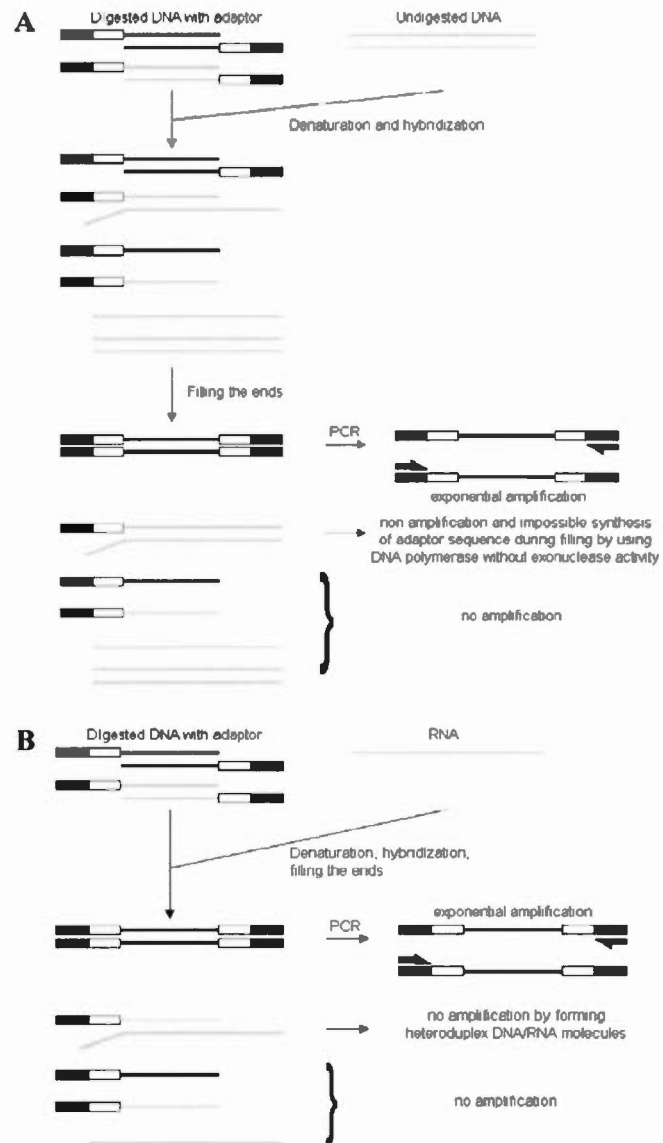


Figure 4

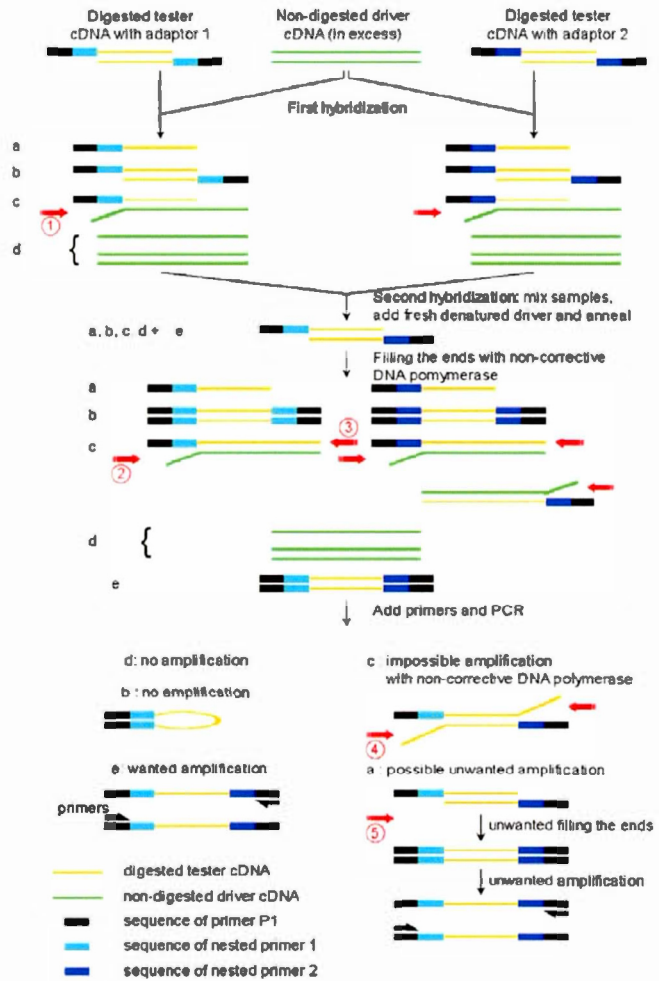


Figure 5



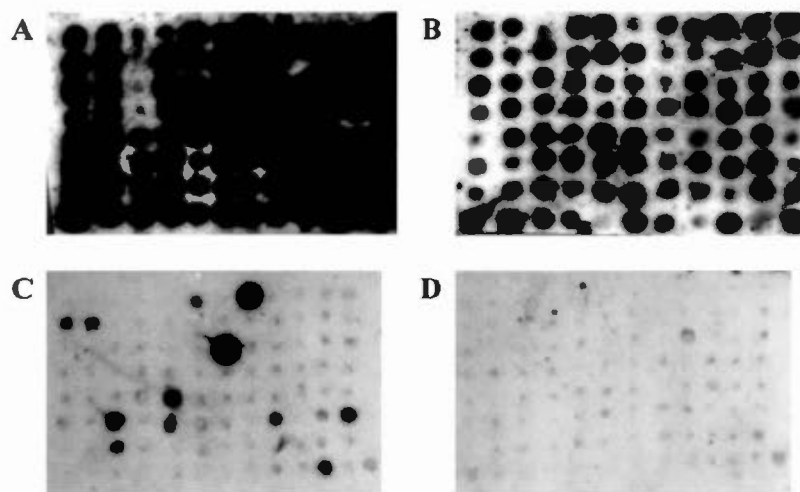


Figure 6

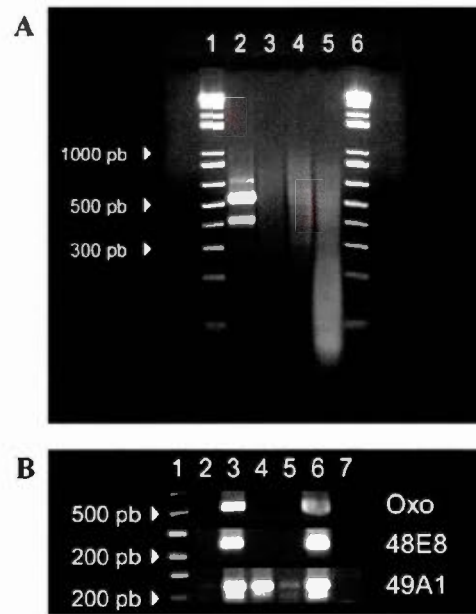


Figure 7

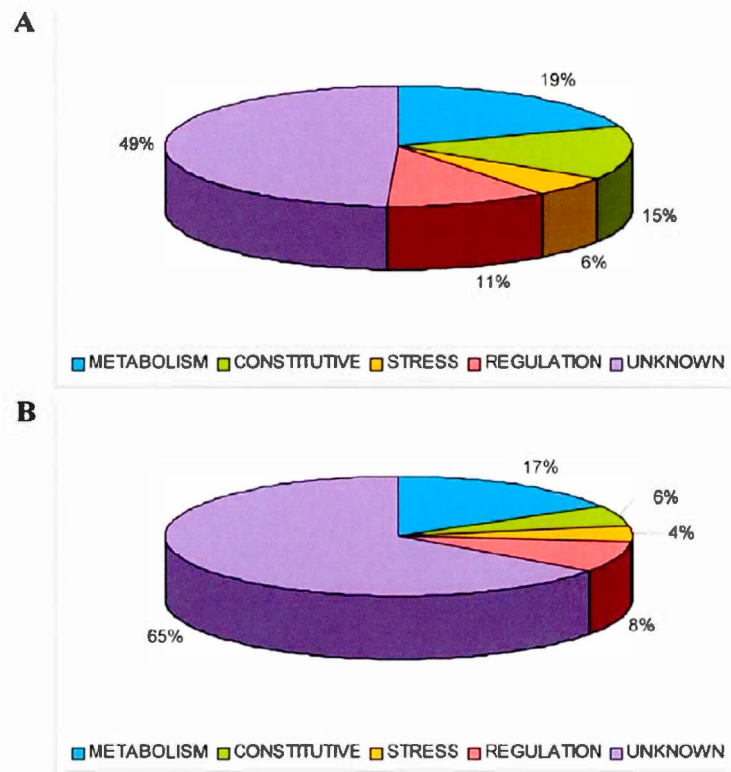


Figure 8

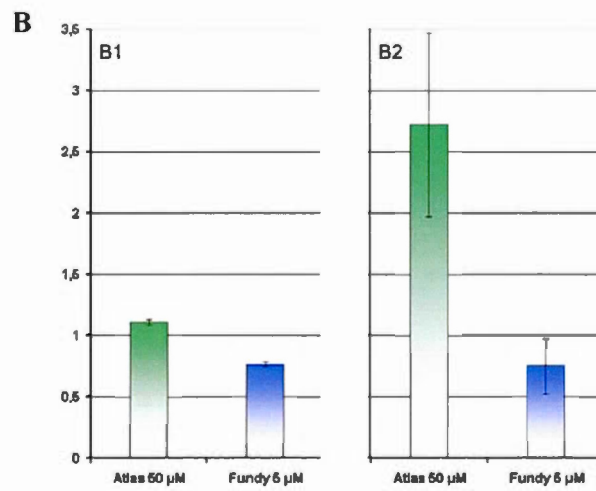
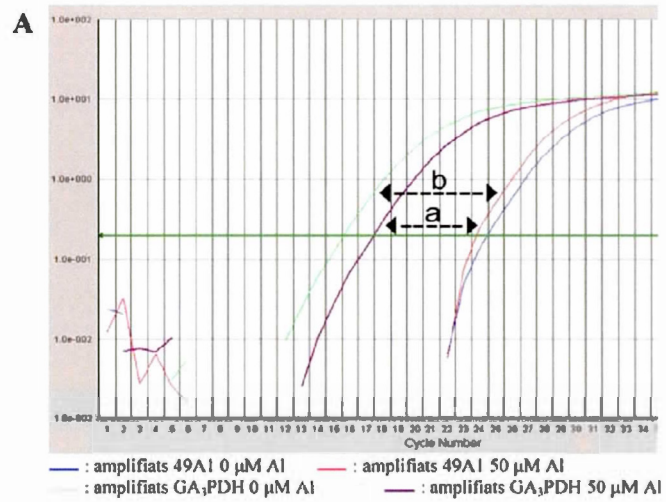


Figure 9

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

**Ackley D.C and Yokel R.A. (1997).** Aluminum citrate is transported from brain into blood via the monocarboxylic acid transporter located at the blood-brain barrier. *Toxicology* **120** : 89-97

**Ackley D.C. and Yokel R.A. (1998).** Aluminum transport out of brain extracellular fluid is proton dependent and inhibited by mersalyl acid, suggesting mediation by the monocarboxylate transporter (MCT1) *Toxicology* **127** : 59-67

**Ahn S.J., Rengel Z. and Matsumoto H. (2004).** Aluminum-induced plasma membrane surface potential and H<sup>+</sup>-ATPase activity in near-isogenic wheat lines differing in tolerance to aluminum. *New Phytol* **162** : 71-79

**Allen D.D., Orvig C., and Yokel R.A. (1995).** Evidence for energy-dependent transport of aluminum out of brain extracellular fluid. *Toxicology* **98** : 31-39

**Aniol A. (1990).** Genetics of tolerance to aluminium in wheat (*Triticum aestivum* L. Thell). *Plant and Soil* **123** : 223-227.

**Aniol A. M. (1995).** Physiological aspects of aluminium tolerance associated with the long arm of chromosome 2D of the wheat (*Triticum aestivum* L.) genome. *Theor. Appl. Genet.* **91** : 510-516.

**Aniol A. and Gustafon J. P. (1984).** Chromosome location of genes controlling aluminum tolerance in wheat, rye and triticale. *Can. J. Gen. Cytol.* **26** : 701-705.

**Aviv H. and Leder P. (1972).** Purification of biologically active globin messenger RNA by chromatography on oligothymidylic acid-cellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69** : 1408-1412.

**Baluška F. Volkmann D. and Barlow P. W. (1996).** Specialized zones of development in roots : view from the cellular level. *Plant Physiol.* **112** : 3-4.

**Basu U., Basu A. and Taylor G. J. (1994a).** Differential exudation of polypeptides by roots of aluminum-resistant and aluminum-sensitive cultivars of *Triticum aestivum* L. in response to aluminum stress. *Plant Physiol.* **106** : 151-158.

**Basu A., Basu U. and Taylor G. J. (1994b).** Induction of microsomal membrane proteins in roots of an aluminum-resistant cultivar of *Triticum aestivum* L. under conditions of aluminum stress. *Plant Physiol.* **104** : 1007-1013.

**Basu U., Good A. G., Aung T., Slaski J. J., Basu A., Briggs K. G. and Taylor G. J. (1999).** A 23-kDa, root  $\alpha$ -irrigere polypeptide co-segregates with aluminum resistance in *Triticum aestivum*. *Physiol. Plant.* **106** : 53-61.

**Berzonsky W. A. (1992).** The genomic inheritance of aluminum tolerance in "Atlas66" wheat. *Genome* **35** : 689-693.

**Boscolo P. R. S., Menossi M. and Jorge R.A. (2003).** Aluminum-induced oxidative stress in maize. *Phytochemistry* **62** : 181-189.

**Brenner S., Johnson M., Bridgham J., Golda G., Lloyd D.H., Johnson D., Luo S., McCurdy S., Foy M., Ewan M., Roth R., George D., Eletr S., Albrecht G., Vermaas E., Williams S.R., Moon K., Burcham T., Pallas M., DuBridge R.B., Kirchner J., Fearon K., Mao J. and Corcoran K. (2000).** Gene expression analysis by massively parallel signature sequencing (MPSS) on microbead arrays. *Nat Biotechnol* **18** : 630-634

**Cakmak I. And Horst W.J. (1991).** Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). *Physiol. Plant* **83** : 463-468.

**Camargo C. E. O. (1981).** Melhoramento do trigo. I. Hereditariedade da tolerancia a toxicidade do aluminio. *Brangantia* **40** : 33-45.

**Camargo C. E. O., Neto A. T., Filho A. W. P. F. and Felicio J. C. (2000).** Genetic control of aluminium in mutant lines of wheat cultivar Anuhuac. *Euphytica* **114** (1) : 47-53.

**Carver B. F., Whitmore W. E., Smith E. L. and Bona L. (1993).** Registration of four aluminum-tolerant winter wheat germplasms and two susceptible near-isolines. *Crop Sci.* **33** : 1113-1114.

**Cerff R. (1978).** Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (NADP) from *Sinapi alba* L. *Plant Physiol.* **61** : 369-372

**Cerff R. (1979).** Quaternary structure of higher plant glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenases. *Eur. J. Biochem.* **94** : 243-247.

**Cerff R. (1982).** Separation and purification of NAD- and NADP-linked glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenases from higher plants. *Methods in chloroplast molecular biology*. M. Edelman, R/B/ Hallick and N-H Chua Eds. Elsevier, Amsterdam, pp 683-694.

- Chaney R., Malik M., Li Y.M., Brown S.L., Brewer E.P., Angle J.S., and Baker A.J.M. (1997).** Phytoremediation of soil metals. *Curr Opi Biotechnol* **8** : 279-284
- Clarke N.D. and Berg J.M. (1998).** Zinc fingers in *Caenorhabditis elegans*: finding families and probing pathways. *Science* **282** : 2018-2022
- Clemens S., Kim E.J., Neumann D. and Schroeder J.I. (1999).** Tolerance to toxic metals by a gene family of phytochelatin synthases from plants and yeast. *EMBO J* **18** : 3325-3333
- Clemens S. (2001).** Molecular mechanisms of plant tolerance and homeostasis. *Planta* **212** : 475-486.
- Champoux M. (2002).** Effet de l'aluminium sur l'expression de l'oxalate oxydase chez le blé (*Triticum aestivum*). Mémoire de maîtrise, Université du Québec à Montréal.
- Chen L-S, Qi Y-P, Smith B. R. and Liu X-H (2005).** Aluminum-induced decrease in CO<sub>2</sub> assimilation in citrus seedlings is unaccompanied by decreased activities of key enzymes involved in CO<sub>2</sub> assimilation. *Tree Physiol* **25** : 317-324
- Christiansen-Weniger C., Groneman A. F. and van Veen J. A. (1992).** Associative N<sub>2</sub> fixation and root exudation of organic acids from wheat cultivars of different aluminum tolerance. *Plant Soil* **139** : 167-174.
- Cohen C.K, Fox T.C., Garvin D.F., Kochian L.V. (1998).** The role of iron-deficiency stress responses in stimulating heavy metal transport in plant. *Plant Physiol* **123** : 825-833.
- Cruz-Ortega R., Cushman J. C. and Ownby J. D. (1997).** CDNA clones encoding 1,3- $\beta$ -glucanase and fimbrin-like cytoskeletal protein are induced by Al toxicity in wheat roots. *Plant Physiol.* **114** : 1453-1460.
- Culotta V.C., Klomp L.W., Strain J., Casareno R.L., Krems B., and Gitlin J.D. (1997).** The copper chaperone for superoxide dismutase. *J Biol Chem* **272** : 23469-23472.
- Curie C., Alonso J.M., Le Jean M., Ecker J.R. and Briant J.F. (2000).** Involvement of NRAMP1 from *Arabidopsis thaliana* in iron transport. *Biochem J* **327**: 749-755.

**De La Fuente J. M., Ramírez-Rodríguez V., Cabrera-Ponce J. L. and Herrera-Estrella L. (1997).** Aluminium tolerance in transgenic plants by alteration of citrate synthesis. *Science* **276** : 1566-1568.

**Delhaize E., Craig S., Beaton C.D., Bennet R.J., Jagadish V.C. and Randall P.J. (1993a).** Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.) / I. Uptake and distribution of aluminum in root apices. *Plant Physiol.* **103** : 685-693.

**Delhaize E., Ryan P. R. and Randall P. J. (1993).** Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.) / II. Aluminum-stimulated excretion of malic acid from root apices. *Plant Physiol.* **103** : 695-702.

**Delhaize E. and Ryan P. R. (1995).** Aluminum toxicity and tolerance in plants. *Plant Physiol.* **107** : 315-312.

**Delhaize E., Hebb D. M., Richards K. D., Lin J.M., Ryan P. R. and Gardner R. C. (1999).** Cloning and expression of a wheat (*Triticum aestivum* L.) phosphatidylserine synthase cDNA. *J. Biol. Chem.* **274** : 7082-7088.

**Delhaize E., Hebb D. M. and Ryan P. R. (2001).** Expression of a *Pseudomonas aeruginosa* citrate synthase gene in tobacco is not associated with either enhanced citrate accumulation or efflux. *Plant Physiol.* **125** : 2059-2067.

**Delhaize E, Ryan PR, Hebb DM, Yamamoto Y, Sasaki T, Matsumoto H. (2004).** Engineering high-level aluminum tolerance in barley with the ALMT1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **101**(42) : 15249-54

**Delisle G., Champoux C. and Houde M. (2001).** Characterization of oxalate oxidase and cell death in Al-sensitive and tolerant wheat roots. *Plant Cell Physiol.* **42**(3) : 324-333.

**Desai S., Hill J., Trelogan S., Diatchenko L. and Siebert P.D. (2000)** in *Functional Genomics*, eds. Hunt, S.P. & Livesey F.J. (Oxford University Press), pages : 105-112.

**Diatchenko L., Lau Y-F. C., Campbell A. P., Chenchik A., Moqadam F., Huang B., Lukyanov S., Lukyanov K., Gurskaya N., Sverdlov E. and Siebert P. D. (1996).** Suppression subtractive hybridization : a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93** : 6025-6030.

**Diatchenko L., Chenchik, A. and Siebert, P. D. (1998)** in *Gene Cloning and Analysis by RT-PCR*, eds. Siebert, P.D. & Larrick J.W. (Natick, MA), pages : 213-237.



**Dinkelaker B., Römheld V. and Marschner H. (1989).** Citric acid excretion and precipitation of calcium citrate in the rhizosphere of white lupin (*Lupinus albus* L.). *Plant Cell Environ* **12** : 285-292

**Eide D., Broderius M., Fett J. and Guerinot M.L. (1996).** A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. *Proc Natl Sci USA* **93**: 5624-5628

**Epstein E., Rains D. W. and Elzam O. E. (1963).** Resolution of dual mechanisms of potassium absorption by barley roots. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **49** : 684-692.

**Ezaki B., Yamamoto Y. and Matsumoto H. (1995).** Cloning and sequencing of the cDNAs induced by aluminium treatment and Pi starvation in cultured tobacco cells. *Physiol. Plant.* **93** : 11-18.

**Ezaki B., Tsugita S. and Matsumoto H. (1996).** Expression of a moderately anionic peroxidase induced by aluminium treatment in tobacco cells : possible involvement of peroxidase isozymes in aluminum ion stress. *Physiol. Plant.* **96** : 21-28.

**Ezaki B., Koyanagi M., Gardner R.C. and Matsumoto H. (1997).** Nucleotide sequence of a cDNA for GDP dissociation inhibitor (GDI) which is induced by aluminum (Al) ion stress in tobacco cell culture. *Plant Physiol.* **115** : 314.

**Ezaki B., Gardner R.C., Ezaki Y., Kondo H. and Matsumoto H. (1998).** Protective roles of two aluminum (Al)-induced genes, *HSP150* and *SEDI* of *Saccharomyces cerevisiae*, in Al and oxidative stresses. *FEMS Microbiology Letters* **159** : 99-105.

**Ezaki B., Sivaguru M., Ezaki Y., Matsumoto H. and Gardner R.C. (1999).** Acquisition of aluminum tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* by expression of the *BCB* or *NtGDI1* gene derived from plants. *FEMS Microbiology Letters* **171** : 81-87.

**Ezaki B., Gardner R. C., Ezaki Y. and Matsumoto H. (2000).** Expression of aluminum-induced genes in transgenic *Arabidopsis* plants can ameliorate aluminum stress and/or oxidative stress. *Plant Physiol.* **122** : 657-665.

**FAO, 1991.** Production Yearbook, 1990. Vol 44. Rome (Italy).

**Foy C. D., Chaney R. L., and White M. C. (1978).** The physiology of metal toxicity in plants. *Ann. Rev. Physiol.* **29** : 511-66.

- Fu D., Beeler T.J. and Dunn T.M. (1995).** Sequence, mapping and disruption of CCC2, a gene that cross-complements the Ca<sup>2+</sup>-sensitive phenotype of csg1 mutants and encodes a P-type ATPase belonging to the Cu<sup>2+</sup>-ATPase subfamily. *Yeast* **11** : 283-292.
- Gallego F. J., López-Solanilla E., Figueiras A. M. and Benito C. (1998).** Chromosomal location of PCR fragments as a source of DNA markers linked to aluminium tolerance genes in rye. *Theor. Appl. Genet.* **96** : 426-434.
- Gardner W.K., Barber D.A. and Parbery D.G. (1983).** The acquisition of phosphorus by *Lupinus albus* L.: III. The probable mechanism by which phosphorus movement in the soil/ root interface is enhanced. *Plant Soil* **70** : 107-124.
- Gassmann W. and Schroeder J. I. (1994).** Inward-rectifying K<sup>+</sup> channels in root hairs of wheat / A mechanism for aluminum-sensitive low-affinity K<sup>+</sup> uptake and membrane potential control. *Plant Physiol.* **105** : 1399-1408.
- Gietz R.D. and Woods (2002).** Transformation of yeast by the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Methods in Enzymology* **350** : 87-96.
- Glerum D.M., Shtanko A. and Tzagoloff A. (1996).** Characterization of COX17, a yeast gene involved in copper metabolism and assembly of cytochrome oxidase. *J Biol Chem* **271** : 14504-14509.
- Grill E., Winnacker E-L. and Zenk M.H. (1985).** Phytochelatins: the principal heavy-metal complexing peptides of higher plants. *Science* **230** : 674-676.
- Grill E., Löffler S., Winnacker E-L and Zenk M.H. (1989).** Phytochelatins, the heavy-metal-binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific gamma-glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase). *Proc Natl Acad Sci USA* **86** : 6838-6842.
- Grotz N., Fox T., Connolly E., Park W., Guerimot M.L. and Eide D. (1998).** Identification of a family of zinc transporter genes from *Arabidopsis* that respond to zinc deficiency. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 7220-7224
- Gruhn P., Goletti F. Roy R. N. (1995).** A vision for food agriculture and the environment: the vision, challenge and recommended action. *Plant Nutrient Management, Food Security and Sustainable Agriculture: The Future Through 2020* Ed. International Food Policy Press, Washington, DC, pp 1-5.

**Grunstein M. and Hogness D. (1975).** Colony hybridization : a method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72** : 3961-3965.

**Guerinot M.L. and Eide D. (1999).** Zeroing in on zinc uptake in yeast and plants. *Curr Opin Plant Biol* **2**: 244-249.

**Ha S.B., Smith A.P., Howden R., Dietrich W.M., Bugg S., O'Connell M.J., Goldsbrough P.B. and Cobett C.S. (1999).** Phytochelatin synthase genes from *Arabidopsis* and the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Plant Cell* **11** : 1153-1163.

**Hamel F., Breton C. and Houde M. (1998).** Isolation and characterization of wheat aluminum-regulated genes : possible involvement of aluminum as a pathogenesis response elicitor. *Planta* **205** : 531-538.

**Hamilton C. A., Good A.G. and Taylor G.J. (2001).** Induction of vacuolar ATPase and mitochondrial ATP synthase by aluminum in an aluminum-resistant cultivar of wheat. *Plant Physiol.* **125** : 2068-2077.

**Hanazawa M., Mochii M., Ueno N., Kohara Y. and Iino Y. (2001).** Use of cDNA subtraction and RNA interference screens in combination reveals genes required for germ-line development in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci USA* **98** : 8686-8691.

**Hasenstein K. H. and Evans M. L. (1988).** Effects of cations on hormone transport in primary roots of *Zea mays*. *Plant Physiol.* **86** : 890-894.

**Haug A. (1984).** Molecular aspects of aluminium toxicity. *Crt. Rev. Plant Sci.* **1** : 345-373.

**Higo K., Ugawa Y., Iwamoto M. and Korenaga T. (1999).** Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database. *Nucleic Acids Res.* **27** : 297-300

**Himelblau E., Mira H., Lin S.J., Culotta V.C., Penarrubia L. and Amasino R.M. (1998).** Identification of a functional homolog of the yeast copper homeostasis gene ATX1 from *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **117**: 1227-1234.

**Himelblau E. and Amasino R.M. (2000).** Delivering copper within plant cells. *Curr Opin Plant Biol* **3**: 205-210.

**Hirayama T., Kieber J.J., Hirayama N., Kogan M., Guzman P., Nourizadeh S., Alonso J.M., Dailey W.P., Dancis A. and Ecker J.R. (1999).** RESPONSIVE-TO-ANTAGONISTI, a Menkes/Wilson disease-related copper transporter, is required for ethylene signaling in *Arabidopsis*. *Cell* **97**: 383-393.

**Hoekenga O.A., Vision T.J., Shaff J.E., Monforte A.J., Lee G.P., Howell S.H. and Kochian L.V. (2003).** Identification and characterization of aluminum tolerance loci in *Arabidopsis* (Lansberg *erecta* x Columbia) by Quantitative Trait Loci mapping. A physiologically simple but genetically complex trait. *Plant Physiol.* **132** : 936-948.

**Hoekenga O.A., Maron L.G., Piñeros M.A., Cançado G.M.A., Shaff J., Kobatashi Y., Ryan P.R., Dong B., Dehaize E., Sasaki T., Matsumoto H., Yamamoto Y., Koyama H., Kochian L.V. (2006).** *AtALMT1*, which encodes a malate transporter, is identified as one of several genes critical for aluminum tolerance in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 9738-9743.

**Houde M., Danyluk J. and Sarhan F. (1992).** A molecular marker to select for freezing tolerance in gramineae. *Mol. Gen. Genet.* **234** : 43-48

**Huang J. W., Pellet D. M., Papernik L. A. and Kochian L. V. (1996).** Aluminum interactions with voltage-dependent calcium transport in plasma membrane vesicles isolated from roots of aluminum-sensitive and -resistant wheat cultivars. *Plant Physiol.* **110** : 561-569.

**Ishikawa S., Wagatsuma T., Sasaki R. and Ofei-Manu P. (2000).** Comparison of the amount of citric and malic acids in Al media of seven plant species and two cultivars each in five plant species. *Soil Sci. Plant Nutr.* **46 (3)** : 751-758.

**Jackson T. and Reisenauer H. (1984).** Crop response to lime in western United States. F Adams ed, Soil acidity and liming. American society of agronomy, Crop science society of America, Soil science society of America, Madison, WI, pp 33-347.

**Jackson P.J., Unkefer C.J., Doolen J.A., Watt K. and Robinson N.J. (1987).** Poly( $\gamma$ -glutamylcysteinyl)glycine: its role in cadmium resistance in plant cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: 6619-6623.

**Jones D. L. and Kochian L. V. (1995).** Aluminum inhibition of the 1,4,5-triphosphate signal transduction pathway in wheat roots : a role in aluminum toxicity? *Plant Cell* **7** : 1913-1922.

**Jones D. L., Gilroy S., Larsen P. B., Howell S. H. and Kochian L. V. (1998a).** Effect of aluminum on cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis in root hairs of *Arabidopsis thaliana* L. *Planta* **206** : 378-387.

**Jones D. L., Kochian L. V. and Gilroy S. (1998b).** Aluminum induces a decrease in cytosolic calcium concentration in BY-2 tobacco cell cultures. *Plant Physiol.* **116** : 81-89.

**Kampfenkel K., Kurhnir S., Babiychuk E., Inze D. and Van Montagu M. (1995).** Molecular characterization of a putative *Arabidopsis thaliana* copper transporter and its yeast homologue. *J Biol Chem* **270**: 28479-28486

**Kang D.C., LaFrance R., Su Z.Z. and Fisher P.B. (1998).** Reciprocal subtraction differential RNA display: an efficient and rapid procedure for isolating differentially expressed gene sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95** : 13788-13793.

**Keerthisinghe G., Hocking P.J., Ryan P.R. and Delhaize R. (1998).** Effect of phosphorus supply on the formation and function of proteoid roots of white lupin (*Lupinus albus* L.). *Plant Cell Environ* **21** : 467-478

**Kinraide T. B. (1993).** Aluminum enhancement of plant growth in acid rooting media. A case of reciprocal alleviation of toxicity by two toxic cations. *Physiol. Plant.* **88** : 619-625.

**Kiss C., Nishikawa J., Dieckmann A., Takada K., Klein G. and Szekely L. (2003).** Improved subtractive suppression hybridization combined with high density cDNA array screening identifies differentially expressed viral and cellular genes. *J Virol Methods* **107** : 195-203.

**Klomp L.W., Lin S.J., Yuan D.S., Klausner R.D., Culotta V.C. and Gitlin J.D. (1997).** Identification and functional expression of HAH1, a novel human gene involved in copper homeostasis. *J Biol Chem* **272**: 9221-9226.

**Koch W., Kwart M., Laubner M., Heineke D., Stransky H., Frommer W.B. and Tegeder M. (2003).** Reduced amino acid content in transgenic potato tubers due to antisense inhibition of the leaf  $\text{H}^{+}$ / amino acid symporter StAAP1. *Plant J.* **33** : 211-220

**Kochian L. V. (1995).** Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **46** : 237-260.

**Kollmeier M., Felle H. H. and Horst W. J. (2000).** Genotypical differences in aluminum resistance of maize are expressed in the distal part of the transition zone. Is reduced  $\square$  triggered auxin flow involved in inhibition of root elongation by aluminum? *Plant Physiol.* **122** : 945-956.

**Kollmeier M., Dietrich P., Bauer C.S., Horst W.J. and Hedrich R. (2001).** Aluminum activates a citrate-permeable anion channel in the aluminum-sensitive zone of the maize root apex. A comparison between an aluminum-sensitive and aluminum-resistant cultivar. *Plant Physiol.* **126** : 397-410.

**Kondo N., Imai K., Isobe M., Goto T., Murasagi A., Wada-Nakagawa C. and Hayashi Y. (1984).** Cadystin A and B, major unit peptides comprising cadmium binding peptides induced in a fission yeast – separation, revision of structures and synthesis. *Tetrahedron Lett* **25** : 3869-3872.

**Korshunova Y.O., Eide D., Clark W.G., Guerinot M.L. and Pakrasi H.B. (1999).** The IRT1 protein from *Arabidopsis thaliana* is a metal transporter with a broad substrate range. *Plant Mol Biol* **40**: 37-44.

**Koyama H., Kawamura A., Kihara T., Hara T., Takita E. and Shibata D.** Overexpression of mitochondrial citrate synthase in *Arabidopsis thaliana* improved growth on a phosphorus-limited soil. *Plant Cell Physiol.* **41** : 1030.

**Krämer U., Cotter-Howells J.D., Charnock J.M., Baker A.J.M. and Smith A.C. (1996).** Free histidine as a metal chelator in plants that accumulate nickel. *Nature* **379** : 635-638.

**Ku A.S.B., Kano-Murakami Y. and Matsuoka M. (1996).** Evolution and expression of C4 photosynthetic genes. *Plant Physiol.* **111** : 949-957.

**Lane T.W. and Morel F.M. (2000).** A biological function for cadmium in marine diatoms. *Proc Natl Acad Sci USA* **97** : 4627-4631.

**Larsen P.B., Geisler M.J., Jones C.A., Williams K.M., Cancel J.D. (2005).** ALS3 encodes a phloem-localized ABC transporter-like protein that is required for aluminum tolerance in *Arabidopsis*. *Plant J.* **41**(3) : 353-63.

**Lazof D. B., Goldsmith J. G., Ruffy T. W. and Linton R. W. (1994).** Rapid uptake of aluminum into cells of intact soybean root tips. **106** : 1107-1114.

**Leegood R.C. (1990).** Enzymes of the Calvin cycle. *Methods in Plant Biochemistry*. Vol. 3 Ed. P.J. Lea. Academic Press, New York, pp 15-37.

- Li M., Shinano T. and Tadano T. (1997).** Distribution of exudates of lupin roots in the rhizosphere under phosphorus deficient conditions. *Soil Sci. Plant Nutr* **43** : 237-245.
- Liang P. and Pardee A.B. (1992).** Differential Display of eucaryotic mRNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* **257** : 967-971.
- Lin C.M., Koh S., Stacey G., Yu S.M., Lin T.Y. and Tsay Y.F. (2000).** Cloning and functional characterization of a constitutively expressed nitrate transporter gene, OsNRT1, from rice. *Plant Physiol.* **122** : 379-388.
- Lindberg S. and Strid H. (1997).** Aluminium induces rapid changes in cytosolic pH and free calcium and potassium concentrations in root protoplasts of wheat (*Triticum aestivum*). *Physiol. Plant.* **99** : 405-414.
- Lindberg S., Szykier K. and Greger M. (1991).** Aluminium effects of transmembrane potential in cells of fibrous roots of sugar beet. *Physiol. Plant.* **83** : 54-62.
- Lisitsyn N., Lisitsyn N. and Wilger M. (1993).** Cloning the differences between two complex genomes. *Science* **259** : 946-951.
- Llugany M., Poschenrieder C.H. and Barceló J. (1995).** Monitoring of aluminium-induced inhibition of root elongation in four maize cultivars differing in tolerance to aluminium and proton toxicity. *Physiol Plant* **93** : 265-271.
- Lu Y.P., Li Z.S. and Rea P.A. (1997).** AtMRP1 gene of *Arabidopsis* encodes a glutathione S-conjugate pump: isolation and functional definition of a plant ATP-binding cassette transporter gene. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 8243-8248
- Lu Y.P., Li Z.S., Drozdowicz Y.M., Hortensteiner S., Martinoia E. and Rea P.A. (1998).** AtMRP2, an *Arabidopsis* ATP binding cassette transporter able to transport glutathione S-conjugates and chlorophyll catabolites: functional comparisons with AtMRP1. *Plant Cell* **10**: 267-282.
- Ma J. F., Zheng S. J. and Matsumoto H. (1997).** Detoxifying aluminium with buckwheat. *Nature* **390** : 569-570.
- Ma Z. and Miyasaka S. C. (1998).** Oxalate exudation by taro in response to Al. *Plant Physiol.* **118** : 861-865.

**Ma J. F., Taketa S. and Yang Z. M. (2000a).** Aluminum tolerance genes on the short arm of chromosome 3R are linked to organic acid release in triticale. *Plant Physiol.* **122** : 687-694.

**Ma J. F. (2000b).** Role of organic acids in detoxification of aluminum in higher plants. *Plant Cell Physiol.* **41** : 383-390.

**Ma J. F., Ryan P. R. and Delhaize E. (2001).** Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids. *Trends in Plant Science* **6** : 273-278.

**Ma J. F., Shen R., Zhuqing Z., Wissuwa M., Takeuchi Y., Takeshi E. and Yano M. (2002).** Response of rice to Al stress and identification of Quantative Trait Loci for Al tolerance. *Plant Cell Physiol.* **43** : 652-659.

**MacDiarmid C. W. and Gardner R. C. (1998).** Overexpression of the *Saccharomyces cerevisiae* magnesium transport system confers resistance to aluminum ion. *J. Biol. Chem.* **273** : 1727-1732.

**Maitani T., Kubota H., Sato K. and Yamada T. (1996).** The composition of metals bound to class III metallothionein (phytochelatin and its desglycyl peptide) induced by various metals in root cultures of *Rubia tinctorum*. *Plant Physiol* **110** : 1145-1150.

**Maltais K. and Houde M. (2002).** A new biochemical marker for aluminium tolerance in plants. *Physiol Plant* **115** : 81-86.

**Maltais K. (2002).** Identification d'un marqueur de tolérance à l'aluminium chez le blé *Triticum aestivum* et manipulation visant à évaluer le rôle de l'auxine dans la toxicité de ce métal. Mémoire de Maîtrise, Université du Québec à Montréal.

**Martin W. and Cerff R. (1986).** Prokaryotic features of nucleus-encoded enzyme. *Eur. J. Biochem.* **159** : 323-331

**Milla M. A. R., Bulter E., Huete A. R., Wilson C. F., Anderson O. and Gustafson J. P. (2002).** Expressed sequence Tag-based gene expression analysis under aluminum stress in rye. *Plant Physiol* **130** : 1706-1716.

**Miyasaka S. C., Kochian L. V., Shaff J. E. and Foy C. D. (1989).** Mechanisms of aluminum tolerance in wheat : an investigation of genotypic differences in rhizosphere pH,  $K^+$ ,  $H^+$  transport and root-cell membrane potentials. *Plant Physiol.* **91** : 1188-1196.

**Miyasaka S. C., Buta J. G., Howell R. K. and Foy C. D. (1991).** Mechanism of aluminum tolerance in snapbeans. *Plant Physiol.* **96** : 737-743.



- Murphy A. and Taiz L. (1995).** Comparison of metallothionein gene expression and nonprotein thiols in ten *Arabidopsis* ecotypes. Correlation with copper tolerance. *Plant Physiol* **109** : 945-954.
- Murphy A., Zhou J., Goldsbrough P.B. and Taiz L. (1997).** Purification and immunological identification of metallothioneins 1 and 2 from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* **113** : 1293-1301
- Neto A. T., Alves M. C., Camargo C. E. O., Castro J. L. and Filho W. P. F. (2001).** New wheat tolerant to aluminum toxicity obtained by mutation induction. *Pesq. Agropec. Bras.* **36** : 61-70.
- Neumann G., Massonneau A., Mertinoia E. and Römheld V. (1999).** Physiological adaptations to phosphorus deficiency during proteoid root development in white lupin. *Planta* **208** : 373-382
- Nguyen V. T., Nguyen B. D., Sarkarung S., Martinez C., Paterson A. H. and Nguyen H. T. (2002).** Mapping of genes controlling aluminum tolerance in rice: comparison of different genetic backgrounds. *Mol Genet Genomics* **267** : 772-780.
- Nguyen B. D., Brar D. S., Bui B. C., Nguyen T. V., Pham L. N. and Nguyen H. T. (2003).** Identification and mapping of the QTL for aluminum tolerance introgressed from the new source, *Oryza rufipogon* Griff, into indica rice (*Oryza sativa* L.). *Theor Appl Genet* **106** : 583-593.
- Ohno T., Koyama H. and Hara T. (2003).** Characterization of citrate transport through the plasma membrane in a carrot mutant cell line with enhanced excretion. *Plant Cell Physiol.* **44** : 156-163.
- Palmiter R.D., Cole T.B., Quaife C.J. and Findley S.D. (1998).** ZnT-3, a putative transporter of zinc into synaptic vesicles. *Proc Natl Acad Sci USA* **93** : 14934-14939
- Parker D. R. and Pedler J. F. (1998).** Probing the "malate hypothesis" of differential aluminium tolerance in wheat by using other rhizotoxic ions as proxies for Al. *Planta* **205(3)** : 389-396.
- Paulsen I.T. and Skurray R.A. (1994).** The POT family of transport proteins. *Trends Biochem. Science* **19** : 404.
- Pellet D. M., Grunes D. L. and Kochian L. V. (1995).** Organic acid exudation as an aluminum-tolerance mechanism in maize (*Zea mays* L.). *Planta* **196** : 788-795.

**Pellet D. M., Papernik L. A. and Kochian L. V. (1996).** Multiple aluminum-resistance mechanisms in wheat. *Plant Physiol.* **112** : 591-597.

**Pence N.S., Larsen P.B., Ebbs S.D., Letham D.L., Lasat M.M., Garvin D.F., Eide D. and Kochian L.V. (2000).** The molecular physiology of heavy metal transport in the Zn/Cd hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Proc Natl Acad Sci USA* **97** : 4956-4960.

**Perry J.R., Basrai M.A., Steiner H.Y., Naider F. and Becker J.M. (1994).** Isolation and characterization of a *Saccharomyces cerevisiae* peptide transport gene. *Mol. Cell. Biol.* **14** : 104-115.

**Persans M.W., Yan X., Patnoe J.M., Krämer U. and Salt D.E. (1999).** Molecular dissection of the role of histidine in nickel hyperaccumulation in *Thlaspi goesingense*. *Plant Physiol* **121** : 1117-1126.

**Piñeros M.A. and Kochian L.V. (2001).** A patch-clamp study on the physiology of aluminum toxicity and aluminum tolerance in maize: identification and characterization of Al<sup>3+</sup>-induced anion channels. *Plant Physiol.* **125** : 292-305.

**Piñeros M. A., Magalhaes J. V., Alves V. M. C. and Kochian L. V. (2002).** The physiology and biophysics of an aluminum tolerance mechanism based on root citrate exudation in maize. *Plant Physiol.* **129** : 1194-1206.

**Pufahl R.A., Singer C.P., Peariso K.L., Lin S.J., Schmidt P.J., Fahrni C.J., Culotta V.C., Penner-Hahn J.E. and O'Halloran T.V. (1997).** Metal ion chaperone function of the soluble Cu(I) receptor ATX1. *Science* **278**: 853-856.

**Puissant C. and Houdeline L-M. (1990).** An improvement of the single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Biotechniques* **8** : 148-149.

**Rae T.D., Schmidt P.J., Pufahl R.A., Culotta V.C. and O'Halloran T.V. (1999).** Undetectable intracellular free copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase. *Science* **284** : 805-808.

**Raman H., Zhang K., Cakir M., Appels R., Garvin D.F., Maron L.G., Kochian L.V., Moroni J.S., Raman R., Imtiaz M., Drake-brockman F., Waters I., Martin P., Sasaki T., Yamamoto Y., Matsumoto H., Hebb D.M.; Delhaize E. and Ryan P. (2005).** Molecular characterization and mapping of ALMT1, the aluminum-tolerance gene of bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Genome* **48** : 781-791.

- Rao I.M., Zeigler R.S., Vera R. and Sarkarung S. (1993).** Selection and breeding for acid-soil tolerance in crops. *Bioscience* **43** : 454-465.
- Rausser W.E. (1995).** Phytochelatins and related peptides. Structure, biosynthesis, and function. *Plant Physiol* **109** : 1141-1149.
- Rausser W.E. (1999).** Structure and function of metal chelators produced by plants. *Cell Biochem Biophys* **31** : 19-48
- Rea P.A., Li Z-S., Lu Y-P., Drozdowicz Y.M., Martinoia E. (1998).** From vacuolar GS-X pumps to multispecific ABC transporters. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **49** : 727-760.
- Rebrikov D.V., Britanova O.V., Gurskaya N.G., Lukyanov K.A., Tarabykin V.S. and Lukyanov S.A. (2000).** Mirror orientation selection (MOS): a method for eliminating false positive clones from libraries generated by suppression subtractive hybridization. *Nucleic Acids Res.* **28** : E90
- Richards K. D., Snowden K. C. and Gardner R. C. (1994).** *wali6* and *wali7* : genes induced by aluminum in wheat (*Triticum aestivum* L.) roots. *Plant Physiol.* : **105** : 1455-1456.
- Richards K.D., Schott E.J., Sharma Y.K. David K.R. and Gardner R.C. (1998).** Aluminium induces oxidative stress genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **116** : 409-418.
- Rincón M. and Gonzales R. A. (1992).** Aluminum partitioning in intact roots of aluminum-tolerant and aluminum-sensitive wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. *Plant Physiol.* **99** : 1021-1028.
- Robinson N.J., Tommey A.M., Kuske C. and Jackson P.J. (1993).** Plant metallothioneins. *Biochem J* **295** : 1-10
- Robinson N.J., Wilson J.R. and Turner J.S. (1996).** Expression of the type 2 metallothionein-like gene MT2 from *Arabidopsis thaliana* in Zn(2+)-metallothioneine-deficient *Synechococcus* PCC 7942: putative role for MT2 in Zn2+ metabolism. *Plant Mol Biol* **30** : 1169-1179.
- Ryan P. R., Di Tomaso J. M. and Kochian L. V. (1993).** Aluminium toxicity in roots : an investigation of spatial sensitivity and the role of the root cap. *J. Exp. Bot.* **44** : 437-446.

**Ryan P. R., Kinraide T. B. and Kochian L. V. (1994).** Al<sup>3+</sup>-Ca<sup>2+</sup> interactions in aluminum rhizotoxicity. I. Inhibition of root growth is not caused by reduction of calcium uptake. *Planta* **192** : 98-103.

**Ryan P. R., Delhaize E. and Randall P. J. (1995a).** Malate efflux from root apices and tolerance to aluminium highly correlated in wheat. *Aust. J. Plant Physiol.* **22** : 531-536.

**Ryan P.R., Delhaize E. and Randall P. J. (1995b).** Characterisation of Al-stimulated efflux of malate from the apices of Al-tolerant wheat roots. *Planta* **196** : 103-110.

**Ryan P.R., Skerret M., Findlay G.P., Delhaize E. and Tyerman S.D. (1997).** Aluminum activates an anion channel in the apical cells of wheat roots. *Proc. Natl. Sci. USA* **94** : 6547-6552.

**Ryan P.R., Delhaize E. and Jones D.L. (2001).** Function and mechanism of organic anion exudation from plant roots. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **52** : 527-560.

**Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989).** Molecular cloning: A laboratory manual, 2nd. vol. 1-3, CSH Laboratory press.

**Sasaki M., Yamamoto Y. and Matsumoto H. (1996).** Lignin deposition induced by aluminum in wheat (*Triticum aestivum*) roots. *Physiol Plant* **96** : 193-198

**Sasaki T., Esaki B. and Matsumoto H. (2002a).** A gene encoding multidrug resistance (MDR)-like protein is induced by aluminum and inhibitors of calcium flux in wheat. *Plant Cell Physiol.* **43(2)** : 177-185.

**Sasaki T., Yamamoto Y., Ezaki B. Katsuhara M. and Matsumoto H (2002b).** Cloning and characterization of a gene expressed in aluminum-tolerant wheat. *Plant Cell Physiol.* **43** Supplement: s51.

**Sasaki T., Yamamoto Y., Ezaki B., Katsuhara M., Ahn S.J., Ryan P.R., Delhaize E. and Matsumoto H. (2004).** A wheat gene encoding an aluminum-activated malate transporter. *Plant J.* **37** : 645-653.

**Schat H. and Vooijs R. (1997).** Multiple tolerance and co-tolerance to heavy metals in *Silene vulgaris*: a co-segregation analysis. *New Phytol* **136** : 489-496.

**Schachtman D. P. and Schroeder J. I. (1994).** Structure and transport mechanism of a high-affinity potassium uptake from higher plants. *Nature* **370** : 655-658.

**Schena M., Shalon D., Davis R.W. and Brown P.O. (1995).** Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* **270** : 467-470.

**Schmöger M.E., Oven M. and Grill E. (2000).** Detoxification of arsenic by phytochelatins in plants. *Plant Physiol* **122** : 793-801.

**Shen H., He L.F., Sasaki T., Yamamoto Y., Zheng S.J., Ligaba A., Yan X.L., Ahn S.J., Yamagushi M., Sasakawa H. and Matsumoto H. (2005).** Citrate secretion coupled with the modulation of soybean root tip under aluminum stress. Up-regulation of transcription, translation, and threonine-oriented phosphorylation of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *Plant Physiol.* **138** : 287-296.

**Sibov S. T., Gaspar M., Silva M. J., Ottoboni L. M. M., Arruda P. and Souza A. P. (1999).** Two genes control aluminum tolerance in maize: genetic and molecular mapping analyses. *Genome* **42** : 475-482.

**Silva I. R., Smyth T. J., Moxley D. F., Carter T. E., Allen N. S. and Rufty T. W. (2000).** Aluminum accumulation at nuclei of cells in the root tip. Fluorescence detection using lumogallion and confocal laser scanning microscopy. *Plant Physiol.* **123** : 543-552.

**Sivaguru M. and Horst W. J. (1998).** The distal part of the transition zone is the most aluminum-sensitive apical root zone of maize. *Plant Physiol.* **116** : 155-163.

**Sivaguru M., Baluška F., Volkmann D., Felle H. H. and Horst W. J. (1999).** Impacts of aluminum on the cytoskeleton of the maize root apex. Short-term effects on the distal part of the transition zone. *Plant Physiol.* **119** : 1073-1082.

**Snowden K. C. and Gardner R. C. (1993).** Five genes induced by aluminum in wheat (*Triticum aestivum* L.) roots. *Plant Physiol.* **103** : 855-861.

**Song W., Steiner H.Y., Zhang L., Naider F., Stacey G. and Becker J.M. (1996).** Cloning of a second *Arabidopsis* peptide transport gene. *Plant Physiol.* **110** : 171-178.

**Tang Y., Garvin D. F., Kochian L. V., Sorrells M. E. and Carver B. F. (2002).** Physiological genetics of aluminum tolerance in the wheat cultivar Atlas 66. *Crop Sci.* **42** : 1541-1546.

**Taylor G. J. (1988).** The physiology of aluminum tolerance. *Metal Ions in Biological Systems : Aluminum and its Role in Biology* vol. **24**. New York, Marcel Dekker. Pages : 165-198.

**Taylor G. J., Basu A., Basu U., Ślaski J.J., Zhang G. and Good A. (1997).** Al-induced, 51-kilodalton, membrane-bound proteins are associated with resistance to Al in a segregating population of wheat. *Plant Physiol.* **114** : 363.

**Tesfaye M., Temple S. J., Allan D. L., Vance C. P. and Samac D. A. (2001).** Overexpression of malate dehydrogenase in transgenic alfalfa enhances organic acid synthesis and confers tolerance to aluminum. *Plant Physiol.* **127** : 1836-1844.

**Thomine S., Wang R., Ward J.M., Crawford N.M., Schroeder J.I. (2000).** Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in *Arabidopsis* with homology to Nramp genes. *Proc Natl Acad Sci USA* **97** : 4991-4996.

**Tommasini R., Vogt E., Fromenteau M., Hortensteiner S., Matile P., Amrhein N., Martinoia E. (1998).** An ABC-transporter of *Arabidopsis thaliana* has both glutathione-conjugate and chlorophyll catabolite transport activity. *Plant J.* **13**: 773-780.

**Vatamaniuk O.K., Mari S., Lu Y.P. and Rea P.A. (1999).** AtPCS1, a phytochelatin synthase from *Arabidopsis*: isolation and in vitro reconstitution. *Proc Natl Acad Sci USA* **96** : 7110-7115.

**Vásquez M.D., Poschenrieder C., Corrales I. And Barceló J. (1999).** Change in apoplastic aluminum during the initial growth response to aluminum by roots of a tolerant maize variety. *Plant Physiol.* **119** : 435-444.

**Velculescu V.E., Zhang L., Vogelstein B. and Kinzler K.W. (1995).** Serial analysis of gene expression. *Science* **270** : 484-487.

**Von Uexküll H. R. and Mutert E. (1995).** Global extent, development and economic impact of acid soils. *Plant and Soil* **171** : 1-15.

**Watt D.A. (2003).** Aluminum-responsive genes in sugarcane: identification and analysis of expression under oxidative stress. *J Exp Bot.* **54(385)** : 1163-1174.

**Wenzl P., Patiño G. M., Chaves A. L., Mayer J. E. and Rao I. M. (2001).** The high level of aluminum resistance in signalgrass is not associated with known mechanisms of external aluminum detoxification in root apices. *Plant Physiol.* **125** : 1473-1484.

**West C.E., Waterworth W.M., Stephens S.M., Smith C.P. and Bray C.M. (1998).** Cloning and functional characterization of a peptide transporter expressed in the scutellum of barley grain during the early stages of germination. *Plant J.* **15** : 221-229.

**Woeste K.E. and Kieber J.J. (2000).** A strong loss-of-function mutation in RAN1 results in constitutive activation of ethylene response pathway as well as a rosette-lethal phenotype. *Plant Cell* **12**: 443-455.

**Wood S., Sebastian K. and Scherr S. (2000).** Soil Resource Condition. Pilot analysis of global ecosystems: Agroecosystems. International food policy research institute and the world resources institute, Washington, DC, pp 45-54.

**Yang G.P., Ross D.T., Kuang W.W., Brown P.O. and Weigel R.J. (1999).** Combining SSH and cDNA microarrays for rapid identification of differentially expressed genes. *Nucleic Acids Res.* **27** : 1517-1523

**Yamamoto Y., Hachiya A. and Matsumoto H. (1997).** Oxidative damage to membrane by a combination of aluminum and iron in suspension-cultured tobacco cells. *Plant Cell Physiol.* **38** : 1333-1339.

**Yamamoto Y., Kobayashi Y. and Matsumoto H. (2001).** Lipid peroxidation is an early symptom triggered in pea roots. *Plant Physiol.* **125** : 199-208.

**Yamamoto Y., Kobayashi Y., Devi S.R., Rikiishi S. and Matsumoto H. (2002).** Aluminum toxicity is associated with mitochondrial dysfunction and the production of reactive oxygen species in plant cells. *Plant Physiol.* **128** : 63-72.

**Yan F., Zhu Y., Müller C., Zörb C. and Schubert S.** Adaptation of H<sup>+</sup>-pumping and plasma membrane H<sup>+</sup> ATPase activity in proteoid roots of white lupin under phosphate deficiency. *Plant physiol.* **129** : 50-63

**Yamashita T., Shimada S., Guo W., Sato K., Kohmura E., Hayakawa T., Takagi T. and Tohyama M. (1997).** Cloning and functional expression of a brain peptide/histidine transporter. *J Biol Chem* **272** : 10205-10211.

**Yanagisawa S. (2000).** Dof1 and Dof2 transcription factors are associated with expression of lutiple genes involves in carbon metabolism in maize. *Plant J.* **21** : 281-288.

**Yuan J.S., Reed A., Chen F., and Stewart C.N. (2006).** Statistical analysis of real-time PCR data. *BMC Bioinformatics* **7** : 85-97

**Zimeri A.M., Dhankher O.P., McCaig B. and Meagher R.B. (2005).** The plant MT1 metallothioneins are stabilized by binding cadmium and are required for cadmium tolerance and accumulation. *Plant Mol Biol* **58** : 839-855

**Zou J. and Goldsbrough P.B. (1994).** Functional homologs of fungal metallothionein genes from *Arabidopsis*. *Plant Cell* **6** : 875-884.