



**HAL**  
open science

# Réponse moléculaire de jeunes plants de pin maritime soumis à un stress hydrique en milieu hydroponique

Christian Dubos

► **To cite this version:**

Christian Dubos. Réponse moléculaire de jeunes plants de pin maritime soumis à un stress hydrique en milieu hydroponique. Biologie végétale. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2001. Français. NNT : 2001NAN10183 . tel-01748671

**HAL Id: tel-01748671**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01748671v1>**

Submitted on 29 Mar 2018

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



S.C.D. - U.H.P. NANCY 1  
BIBLIOTHÈQUE DES SCIENCES  
Rue du Jardin Botanique  
54600 VILLERS-LES-NANCY



Institut National de la Recherche Agronomique

FACULTE DES SCIENCES

**U.F.R. Sciences et Techniques Biologiques**

**Ecole Doctorale : Ingénieries des ressources, Procédés, Produits et Environnement.**

**Département de Formation Doctorale : Agronomie, Environnement.**

## Thèse

Présentée pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université Henri Poincaré, Nancy-I

Mention : Biologie Forestière

par **Christian DUBOS**

# Réponse moléculaire de jeunes plants de pin maritime soumis à un stress hydrique en milieu hydroponique

Soutenue le 15 juin 2001

Membres du jury :

Président :	M. Jean-Michel FAVRE	Professeur, Université Henri Poincaré, Nancy I
Rapporteurs :	M. Arie ALTMAN	Professeur, The Hebrew University of Jerusalem
	M. Arnould SAVOURE	Professeur, Université Pierre et Marie Curie, Paris VI
Examineurs :	M. John CAIRNEY	Assistant Professeur, Institute of Paper Science and Technology, Atlanta
	M. Christophe ROTHAN	Chargé de recherche INRA, Bordeaux
	M. Christophe PLOMION	Chargé de recherche INRA, Bordeaux (Directeur de thèse)

S.C.D. - U.H.P. NANCY 1  
BIBLIOTHEQUE DES SCIENCES  
Rue du Jardin Botanique  
54600 VILLERS-LES-NANCY

*O café,*

*Negro como o Diabolo,  
Quente como o Inferno,  
Puro como um Anjo,  
Doce como o A mor.*

Tout d'abord je tiens à remercier Mr Antoine Kremer de m'avoir accueilli dans son laboratoire et pour les discussions que nous avons eues...au-delà de nos domaines scientifiques respectifs...

Un grand merci à Mr Christophe « le Boss » Plomion, pour son encadrement scientifique, pour la confiance qu'il m'a accordée durant ces trois années, pour sa participation active dans mon travail et surtout pour tous les à-cotés qui rendent la vie de thésard encore plus agréable...

Je remercie Mr Jean-Michel Favre d'avoir accepté de présider le jury de thèse.

Je remercie aussi Messieurs Arie Altman et Arnould Savouré, qui ont accepté d'en être les rapporteurs, et pour le temps et l'intérêt qu'ils ont dédiés à l'évaluation de ce travail.

Je tiens aussi à remercier Messieurs John Cairney et Christophe Rothan d'avoir accepté de faire partie de ce jury.

Je voudrais encore remercier Mme Véronique Decroocq, Mr Stéphane Decroocq, Mr Philippe Gallusci et à nouveau Mr Christophe Rothan d'avoir participé à mes comités de thèse, et aux discussions qui ont suivi.

Voilà maintenant quatre années passées à l'INRA de Pierroton qui touchent à leur fin. Je suis arrivé ici en janvier 1997, lors de mon DEA, pour travailler avec Paulo Costa...et c'est un ami que je me suis fait... Puis, j'ai pris la relève, et maintenant que je m'en vais, c'est à toi Paulo que je dédie ce travail...j'espère que ça te plaira.

Pour la réalisation de ce travail, je voudrais remercier Steph (Decroocq) pour son aide précieuse des premiers instants, avant qu'il nous quitte pour la vigne...Delphine Madur, Céline Lalanne et Grégoire Le Provost le trio de choc, pour leur aide de tous les instants...Pour la partie cartographie des EST, je voudrais remercier Catherine Krier et David Chagné, sans oublier le « grand David » (Pot) qui a réalisé la construction de la carte génétique et la cartographie des QTL (avec son sens inné pour Splus). Enfin, un grand merci à Martine Lemaire pour son aide pour la mise au point des Northern et autres RT-PCR, et surtout pour sa gentillesse et sa disponibilité. Je n'oublierai pas non plus de remercier tous les membres de l'équipe d'écophysiologie qui m'ont permis notamment de réaliser les cultures de pins maritime en conditions contrôlées, et plus particulièrement Anne N'Guyen-Querens, Michel Sartore et Denis Lousteau.

A l'autre bout de la terre, je voudrais aussi remercier Raül Herrera (Chili) pour nos discussions endiablées, pour son aide précieuse pour la rédaction des articles...et surtout pour sa sympathie et sa bonne humeur...sans oublier Alexandra, Xaviera y Camilia. Je voudrais aussi remercier Manuela Casasoli, pour sa gentillesse, son sens aigu de la justice et ses sublimes PASTA !!!...

## Remerciements

---

Un super grand merci à « Jacky » (Grima-Pettenati) avec qui j'ai réalisé mon premier stage au sein d'un laboratoire. Ce fut une expérience enrichissante, autant sur le plan scientifique que humain, qui m'a énormément apporté et servi lors de mon DEA et tout au long de cette thèse.

Je voudrais faire aussi une dédicace spéciale pour « Anita » Uteau qui a participé plus qu'activement à la correction de ce manuscrit...gros boulot !!!...et qui à tout le temps réussi à résoudre toutes mes difficultés administratives...et elles ont été nombreuses...et tout ça dans la bonne humeur !!!

Merci aussi à Delphine (Grivet) avec qui j'ai partagé mon bureau et beaucoup de fous-rires pendant ces trois années. Je sais que ça n'a pas du être une chose facile, et pourtant tu as toujours gardé le sourire...Mais comment as-tu pu rester aussi cool ?...

Je voudrais aussi faire un clin d'œil au personnel de l'Unité Expérimentale pour leurs explications pratiques sur la forêt, à Christian Dauget pour son rire franc, au personnel « du château » pour leur aide et plus particulièrement à Ginette et Danièle pour leur patience.

Je voudrais aussi remercier tous les autres membres du laboratoire ainsi que tous nos visiteurs, et de peur d'oublier quelqu'un je ne citerai personne. Mais je veux que vous sachiez que vous m'avez tous apporté quelque chose pour la réalisation de cette thèse. Mais c'est surtout sur le plan humain que je voudrais vous remercier. Il est vrai que je n'oublierai pas les discussions scientifiques, et encore moins les discussions de comptoir, à café ou autres... Je n'oublierai pas non plus l'entraide, tous les services, les petits mots de réconfort...et parfois les petites tensions qui font que les semaines se suivent sans se ressembler...c'était excellent !!!...

Je n'oublierai pas non plus la spontanéité de tous ceux qui sont venus m'aider à relier...c'était la panique, les cochons étaient dans le maïs !!!...et en un clin d'œil tout s'est arrangé...Alors un super grand merci à vous tous !!!...

Enfin je voudrais remercier ma mère, Stéphanie, mon frère et tous mes potes de Toulouse qui m'ont soutenu de loin, en me demandant sans cesse : « Mais qu'est-ce que tu peux bien faire comme travail ?...et quand est-ce que l'on va un peu te voir ? »...sans oublier Jérémy « le local » pour tous ces moments bien tranquilles que l'on a passés ensemble...

	Page
<b>INTRODUCTION</b>	<b>1</b>
<b>CHAPITRE 1 : Synthèse bibliographique</b>	<b>4</b>
<b>Le pin maritime</b>	<b>5</b>
Introduction	6
<b>1. Origine</b>	<b>6</b>
<b>2. Taxonomie</b>	<b>7</b>
<b>3. Description biologique et habitat</b>	<b>7</b>
<b>4. Répartition géographique</b>	<b>8</b>
<b>5. Poids économique</b>	<b>9</b>
<b>6. Programme d'amélioration génétique</b>	<b>10</b>
<b>7. Le stress hydrique : réponse moléculaire, génétique et physiologique du pin maritime</b>	<b>11</b>
<b>La génomique structurale et fonctionnelle : méthodes et applications</b>	<b>16</b>
Introduction	17
<b>1. La génomique structurale</b>	<b>18</b>
1.1. Le séquençage systématique	18
1.2. Séquençage d'EST (Expressed Sequence Tag)	23
<b>2. La génomique fonctionnelle</b>	<b>25</b>
2.1. Les différentes techniques d'étude du transcriptome	25
2.1.1. Technique combinant PCR et hybridations	26
2.1.1.1. ADNc-RDA (Representational Difference Analysis)	26
2.1.1.2. SSH (Suppression Subtractive Hybridization)	27
2.1.2. Techniques basées sur la PCR	28
2.1.2.1. DDRT-PCR (Differential display)	28
2.1.2.2. AP-PCR (Arbitrarily Primed PCR)	30
2.1.2.3. ADNc-AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)	31
2.1.2.4. Autres techniques	32
2.1.3. Techniques basées sur l'acquisition en masse de séquences codantes	33
2.1.3.1. Réseaux d'ADN (« Arrays » ou « Chips »)	33
2.1.3.2. SAGE (Serial Analysis of Gene Expression)	34
2.1.3.3. Northern électronique (Northern in-silico ou Digital northern)	36
2.2. Protéomique	37
2.2.1. Introduction	37
2.2.2. Méthodes	38
2.2.3. Révélation, digitalisation et traitement d'image	39
2.2.4. Identification des protéines	39
2.2.5. Applications	41

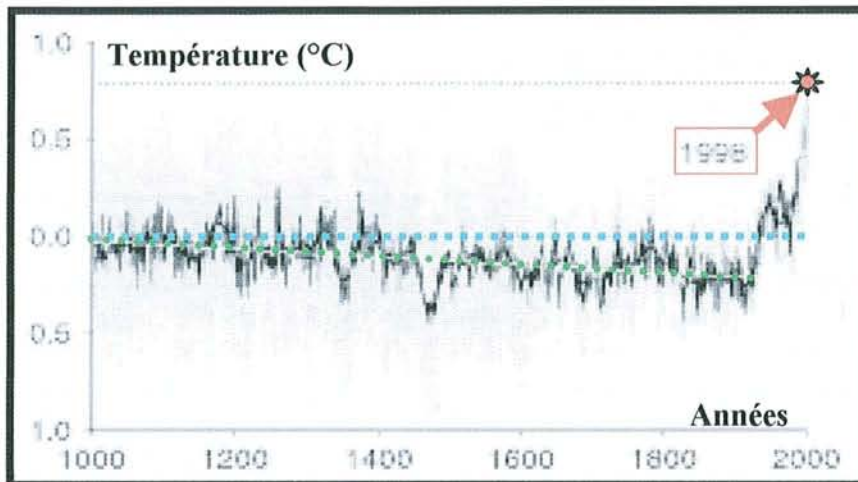
---

<b>Réponse moléculaire des végétaux soumis à un stress hydrique</b>	<b>42</b>
Introduction	43
<b>1. Systèmes tolérants</b>	<b>44</b>
1.1. Les graines	44
1.2. Les plantes reviviscentes	45
1.3. Modèles génétiques	45
1.4. Plantes de grandes cultures	46
<b>2. Gènes régulés au cours du stress</b>	<b>46</b>
2.1. Métabolisme	46
2.2. Ajustement osmotique	48
2.3. Ajustement structural	50
2.4. Dégradation et réparation	51
2.5. Détoxification	52
2.6. Protéines LEA	53
2.7. Métabolisme des sucres	54
<b>3. La régulation de l'expression des gènes lors du stress hydrique</b>	<b>56</b>
3.1. Régulation au niveau de l'ADN génomique	57
3.2. Etude des promoteurs	58
3.3. Seconds messagers et molécules signal	59
3.4. Contrôle post-transcriptionnel	61
<b>4. Plantes transgéniques et détermination de la fonction des gènes</b>	<b>62</b>
Conclusion	65
<b>CHAPITRE 2 : Matériels et méthodes</b>	<b>67</b>
<b>1. Matériel végétal et conditions expérimentales</b>	<b>68</b>
1.1. Germination des graines	68
1.2. Culture hydroponique	68
1.3. Application du stress	69
1.4. Contrôle des conditions de culture	70
1.5. Plan expérimental	70
1.6. Stress rapide	71
<b>2. Mesure des paramètres physiologiques et caractérisation du stress</b>	<b>71</b>
2.1. Mesure du taux de chlorophylles	71
2.2. Mesure des acides gras	71
2.2.1. Extraction des lipides membranaires	71
2.2.2. Séparation des lipides membranaires	72
2.2.3. Préparation des acides gras pour la chromatographie en phase gazeuse	72
2.2.4. Chromatographie en phase gazeuse des acides gras	73
2.2.5. Analyse qualitative et quantitative des acides gras	74
<b>3. Analyse du transcriptome et caractérisation des EST</b>	<b>74</b>
3.1. Extraction des ARN	74
3.2. ADNc-AFLP	74
3.2.1. Synthèse et vérification des ADNc	75
3.2.2. ADNc-AFLP non radioactive	75
3.2.3. ADNc-AFLP radioactive	77
3.2.4. Révélation et isolation des fragments différentiels	77
3.2.5. Clonage et séquençage des TDF	77

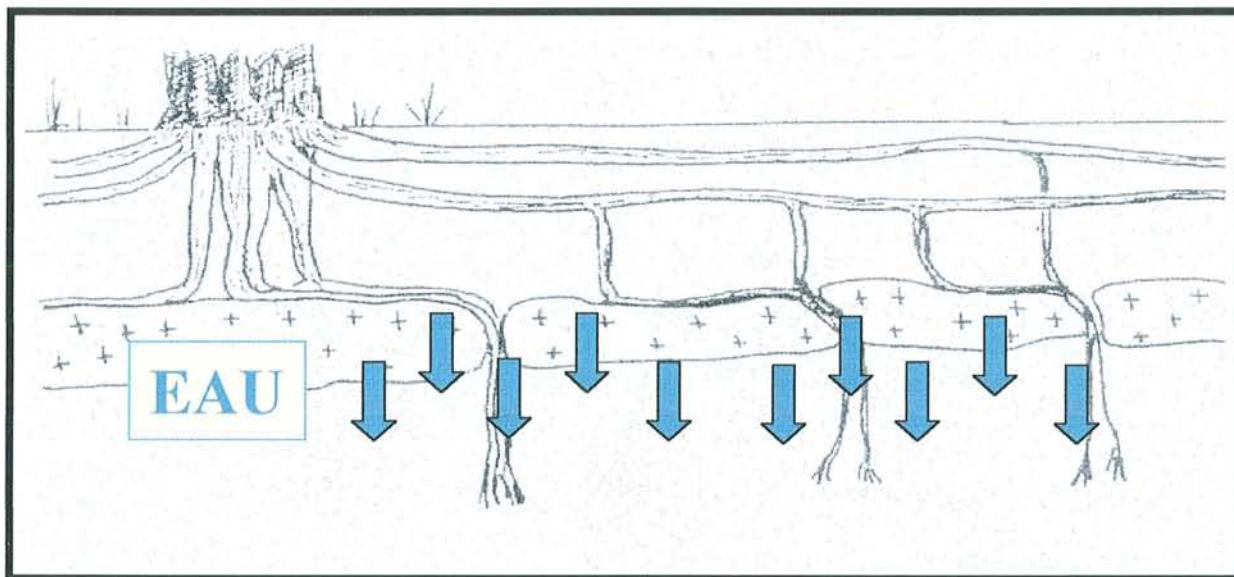


3.3. Analyse d'expression	Rue du Jardin Botanique 54600 VILLERS-LES-NANCY	78
3.3.1. Northern		78
3.3.2. RT-PCR (Rétro-transcription PCR)		79
3.3.3. Recherche des séquences en 3'- et 5'-terminale des TDF		80
3.3.3.1. Recherche des séquences en 3'-terminale des TDF		80
3.3.3.2. Recherche par PCR des séquences en 5'-terminale des TDF		80
3.4. Hybridation Suppressive et Soustractive (SSH)		81
3.5. Analyse des séquences		81
3.5.1. Préparation à l'analyse des séquences		81
3.5.2. Serveurs utilisés pour les analyses des séquences		82
3.5.3. Logiciel utilisés pour les analyses des séquences		83
<b>4. Electrophorèse bidimensionnelle</b>		<b>83</b>
4.1. Extraction des protéines		83
4.2. Electrophorèse bidimensionnelle		84
4.3. Analyse automatique des gels 2D-PAGE		84
4.4. Analyse quantitative entre les deux conditions pour chacun des tissus		84
<b>CHAPITRE 3 : Résultats</b>		<b>86</b>
<b>I. Publication n°1 :</b>		<b>87</b>
Identification of water-deficit responsive genes in maritime pine ( <i>Pinus pinaster</i> Ait.) roots using non radioactive cDNA-AFLP.		
<b>II. Publication n°2 :</b>		<b>116</b>
Identification and characterization of water-deficit responsive genes in hydroponically maritime pine ( <i>Pinus pinaster</i> Ait.) seedlings.		
<b>III. Publication n°3 :</b>		<b>149</b>
Drought differentially affects expression of a PR-10 protein, in needles of maritime pine ( <i>Pinus pinaster</i> Ait.) seedlings.		
<b>IV. Publication n°4 :</b>		<b>155</b>
Histones expresion pattern of maritime pine drought stressed seedlings.		
<b>V. Identification de protéines impliquées dans la réponse au stress hydrique chez le pin maritime</b>		<b>166</b>
<b>VI. Discussion générale</b>		<b>171</b>
<b>1. La photosynthèse</b>		<b>173</b>
<b>2. La croissance</b>		<b>175</b>
<b>3. Signaux de transduction, transcription et traduction</b>		<b>176</b>
<b>4. Le métabolisme primaire</b>		<b>177</b>
<b>6. Les parois</b>		<b>179</b>
<b>7. Les mécanismes de défense</b>		<b>181</b>
<b>8. Conclusion</b>		<b>183</b>

<b>CHAPITRE 4 : Conclusions et perspectives</b>	<b>184</b>
<b>Conclusions</b>	<b>185</b>
<b>Perspectives</b>	<b>189</b>
Introduction	189
<b>1. Etude d'expression</b>	<b>189</b>
1.1. Caractérisation complémentaire des gènes identifiés dans la thèse	189
1.1.1. Validation des niveaux d'expression sur des plants élevés dans un milieu naturel	189
1.1.2. Caractérisation plus fine des gènes	190
1.2. Identification plus exhaustive des gènes impliqués dans la réponse au stress hydrique	192
1.2.1. Exploitation du séquençage systématique d'EST	192
1.2.2. <b>Etude de la réponse précoce</b>	<b>193</b>
1.3. Etude de l'expression au niveau protéique	196
1.4. Etude des métabolites	196
<b>2. Implication des gènes dans la tolérance au stress hydrique</b>	<b>196</b>
2.1. Cartographie des gènes et étude des colocalisations avec des QTL de l'efficacité d'utilisation de l'eau	197
2.2. Mise en place d'une nouvelle expérience	198
2.2.1. Choix d'une famille en ségrégation	198
2.2.2. Choix des conditions de cultures	198
2.2.3. Choix des caractères pour la recherche de QTL	198
2.2.3.1. Détection de TQL (Transcript Quantity Loci)	198
2.2.3.2. Détection de QTL pour des paramètres physiologiques	199
2.2.3.3. Détection de PQL (Protein Quantity Loci)	199
<b>3. Apport de la génétique inverse pour déterminer la fonction des EST</b>	<b>200</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>202</b>



A



B



C

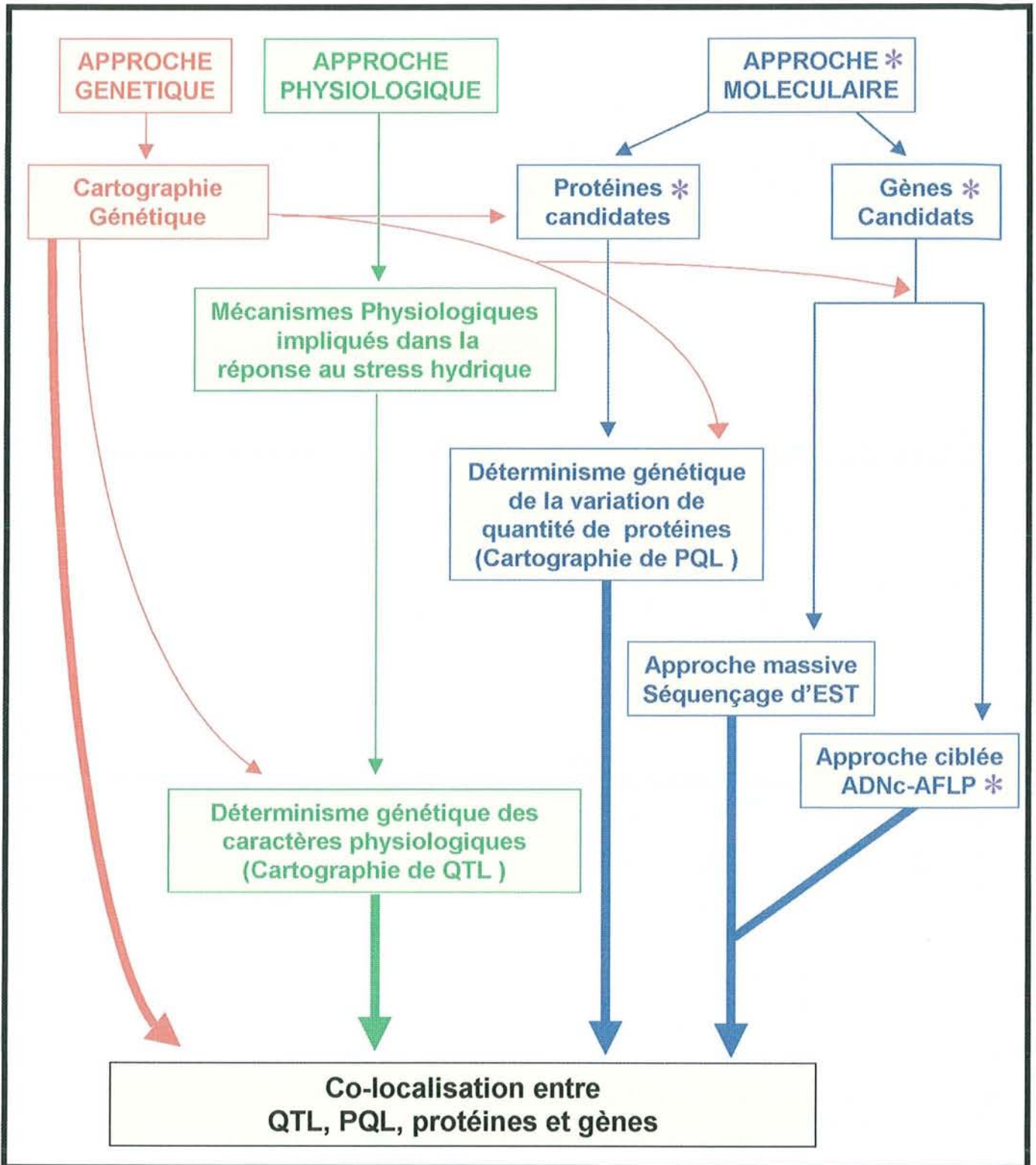
**Figure 1** : A) Evolution de la température au cours du dernier millénaire (d'après Hughes., 2000). B) Représentation schématique de la limitation de la pénétration des racines du pin maritime causée par « l'alias ». C) Système racinaire en « plateau » d'un arbre adulte.

## INTRODUCTION

L'intensification progressive de la sylviculture dans une forêt mono-spécifique aussi vaste que celle du pin maritime n'est pas sans soulever certaines interrogations concernant le développement durable du massif forestier Aquitain. En effet, il apparaît logique de s'attendre à ce que des arbres élites, à croissance plus rapide, aient des exigences accrues dans un milieu déjà caractérisé par des ressources limitées. De plus, le matériel sélectionné aujourd'hui va être multiplié en masse dans 15 à 20 ans et le bois correspondant récolté 50 ans plus tard. Or, durant cette période, les climatologues prévoient un réchauffement climatique global qui pourrait atteindre quelques degrés à l'échéance du XXI<sup>e</sup> siècle (Hughes., 2000 ; figure 1.A.).

Bien que les écosystèmes forestiers puissent évoluer face à des changements climatiques très lents, leurs réactions vis-à-vis de perturbations brutales restent incertaines (Gear et Huntley, 1990). On connaît en effet peu de chose sur le contrôle génétique et les processus physiologiques de l'adaptabilité des arbres forestiers. En clair, la question est de savoir si les variétés créées aujourd'hui seront bien adaptées au climat de demain. La persistance d'une forêt productive pourrait dépendre de la création de variétés combinant d'une part la possibilité de maintenir une croissance suffisante dans des conditions de milieu caractérisées par une faible disponibilité en eau, et d'autre part la possibilité de tolérer et de survivre à de courtes périodes de sécheresse intense. Ceci est accentué par la présence, dans la majeure partie du massif Landais, d'une couche ferreuse (appelée alios) localisée dans l'horizon B (généralement entre 0,3m et 1m de profondeur), qui limite la pénétration du système racinaire tout en restant perméable à l'eau (figure 1.B.), et le déforme fortement (figure 1.C.).

L'adaptation au stress hydrique a été jusqu'à maintenant très peu considérée dans les programmes de sélection des arbres forestiers, car des prédictors qualitatifs ou quantitatifs faciles à mesurer et peu coûteux pour une utilisation en routine sont difficiles à définir. L'identification de critères de sélections phénotypiques (ex : discrimination isotopique du carbone, Farquhar et al., 1989) ou moléculaires (variants alléliques de gènes d'intérêt), constitue l'objectif final des recherches entreprises pour la sélection de génotypes tolérant à un déficit d'alimentation en eau.



**Figure 2** : Relations entre les approches génétique, physiologique et moléculaire de la réponse au Stress hydrique chez le pin maritime.\*): Situation de mon travail de thèse.

Mon travail de recherche s'inscrit dans le cadre d'études menées à l'INRA sur le déterminisme génétique, moléculaire et physiologique de la réponse à un stress hydrique chez le pin maritime. Il se focalise sur l'identification de gènes dont l'expression est régulée lors d'un stress hydrique.

La figure 2 schématise la démarche qui a été adoptée au sein de l'équipe de Génétique et d'Amélioration des Arbres Forestiers (INRA Pierroton) en collaboration avec les équipes d'écophysiologie de l'INRA de Pierroton et de Nancy. Elle consiste à étudier l'architecture génétique de caractères physiologiques *a priori* impliqués dans la réponse au stress hydrique et de relier les QTL (Quantitative Trait Loci) aux gènes/protéines candidats identifiés par des analyses d'expression au niveau du transcriptome/protéome.

Ma thèse sera présentée en quatre grands chapitres :

- **Le Chapitre 1** est une revue bibliographique subdivisée en trois parties. La première partie propose une présentation générale de l'espèce étudiée (le pin maritime), depuis son origine jusqu'à son importance économique. La description du programme d'amélioration ainsi que les travaux antérieurs traitant des réponses génétique et physiologique du pin maritime face à une contrainte hydrique, sont également abordés. La deuxième partie est une synthèse bibliographique sur la génomique structurale et fonctionnelle. Enfin, la troisième partie fait une synthèse des principaux gènes régulés par le stress hydrique et impliqués dans la tolérance. Nous présentons notamment les différents modèles utilisés pour isoler les gènes de stress, les différentes voies métaboliques dans lesquelles ils sont impliqués, ainsi que les phénomènes qui interviennent dans la régulation de leur expression.

- Le **Chapitre 2** expose les principales méthodologies que nous avons utilisées et/ou développées. Nous verrons successivement la description du matériel végétal et des conditions de cultures, les mesures réalisées pour caractériser le stress, les méthodes utilisées dans l'analyse du transcriptome et du protéome.

- Le **chapitre 3** constitue le corps de la thèse. Il regroupe en cinq parties l'ensemble des résultats portant sur l'identification et la caractérisation de gènes et de protéines régulés par un stress hydrique appliqué à de jeunes plantules en milieu hydroponique.

Les quatre premières parties présentent sous forme de publications en anglais les résultats obtenus au niveau du transcriptome. La première publication concerne l'analyse et la caractérisation de fragments d'ADNc isolés au niveau des racines, pour deux conditions hydriques contrastées. La deuxième présente les fragments d'ADNc obtenus au niveau des parties aériennes et leur caractérisation dans un factoriel croisant intensité et durée de stress. La troisième porte sur la caractérisation d'un gène codant pour un membre de la famille des PR-10 (Pathogenesis Related). Enfin, la quatrième publication se focalise sur l'étude d'une famille de gènes : les histones, et la régulation de leur expression au cours du stress hydrique. Dans la cinquième partie, nous abordons un autre niveau de régulation en étudiant les variations d'accumulation quantitative des protéines entre les mêmes conditions contrastées. Finalement, la sixième partie fera l'objet d'une discussion générale reprenant les résultats obtenus tout au long de cette thèse.

- Le **Chapitre 4** conclue ce travail et détaille les perspectives qui nous sont offertes.

S.C.D. - U.H.P. NANCY 1  
BIBLIOTHÈQUE DES SCIENCES  
Rue du Jardin Botanique  
54500 VILLERS-LES-NANCY

# CHAPITRE 1 : Synthèse bibliographique

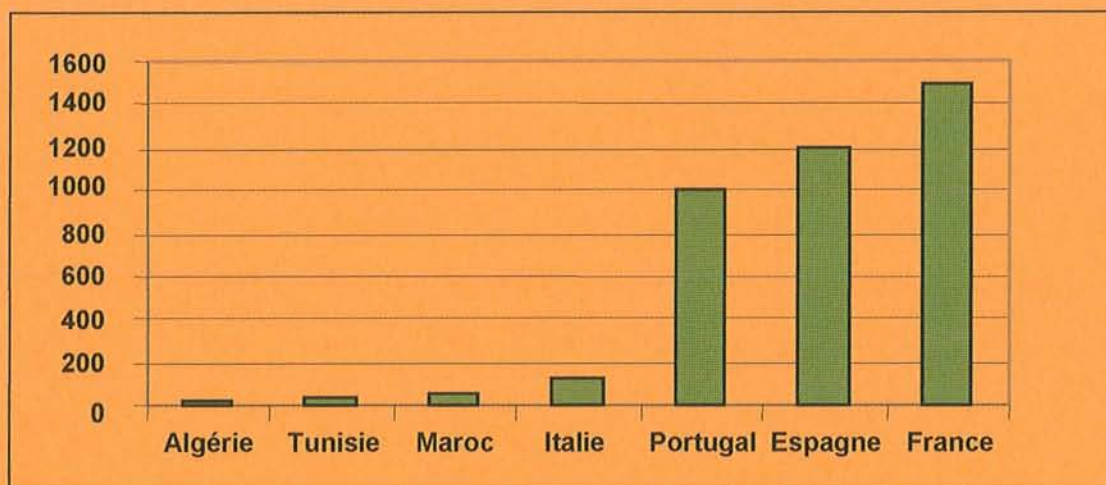
## I. Le pin maritime

## II. La génomique structurale et fonctionnelle : méthodes et applications

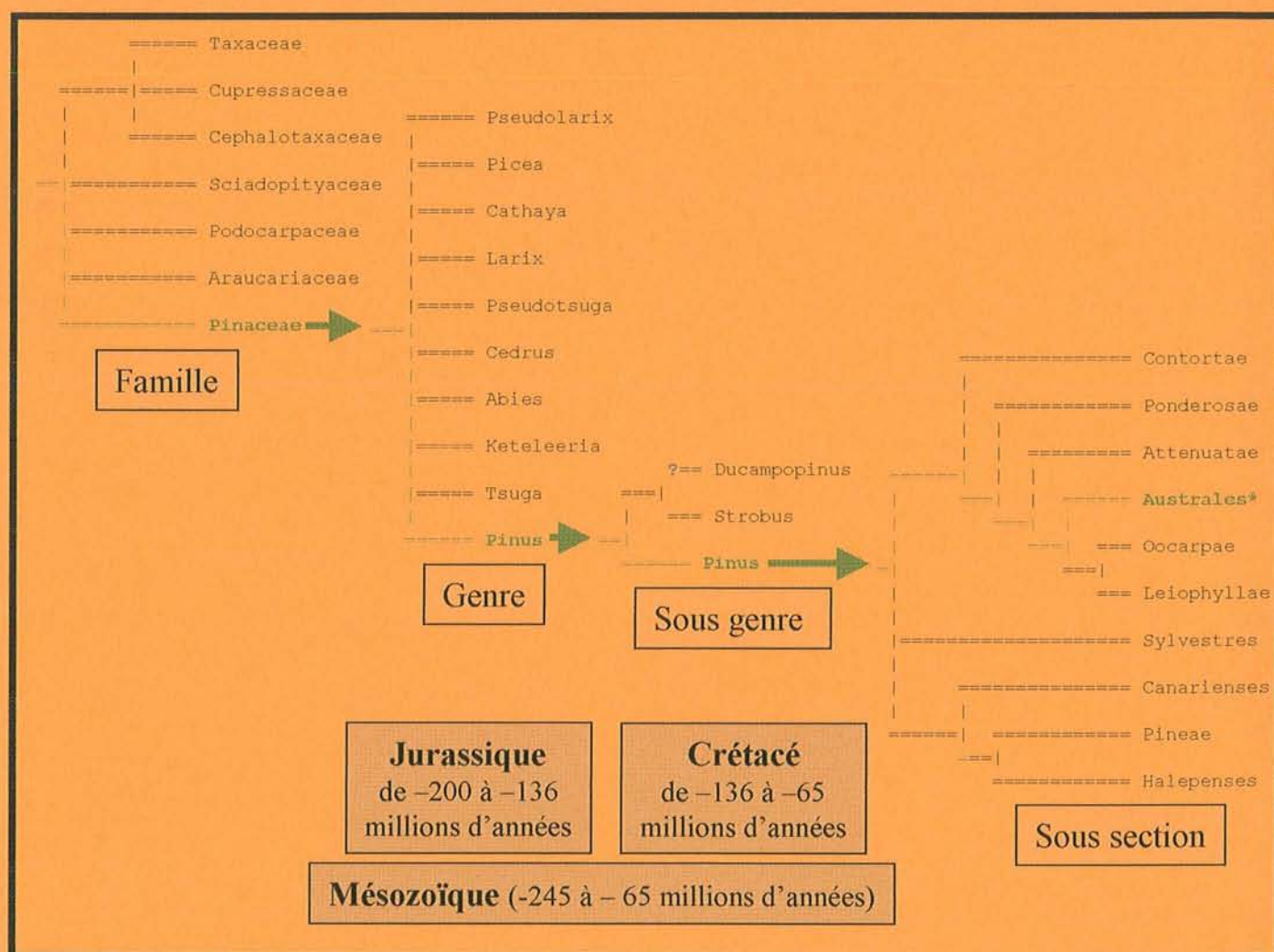
## III. La réponse moléculaire des végétaux soumis à un stress hydrique



## I. Le pin maritime



**Figure 3 :** Surface occupée par le pin maritime dans les pays de son aire naturelle (x1000ha). D'après Ribeiro (2001), <http://pinus.def.mipm-ugvicultura.pt/estatica/invent.htm>.



**Figure 4 :** Arbre phylogénétique de la famille des Pinaceae. D'après l'URL The Tree of Life (<http://phylogeny.arizona.edu/tree/phylogeny.html>).

### Introduction

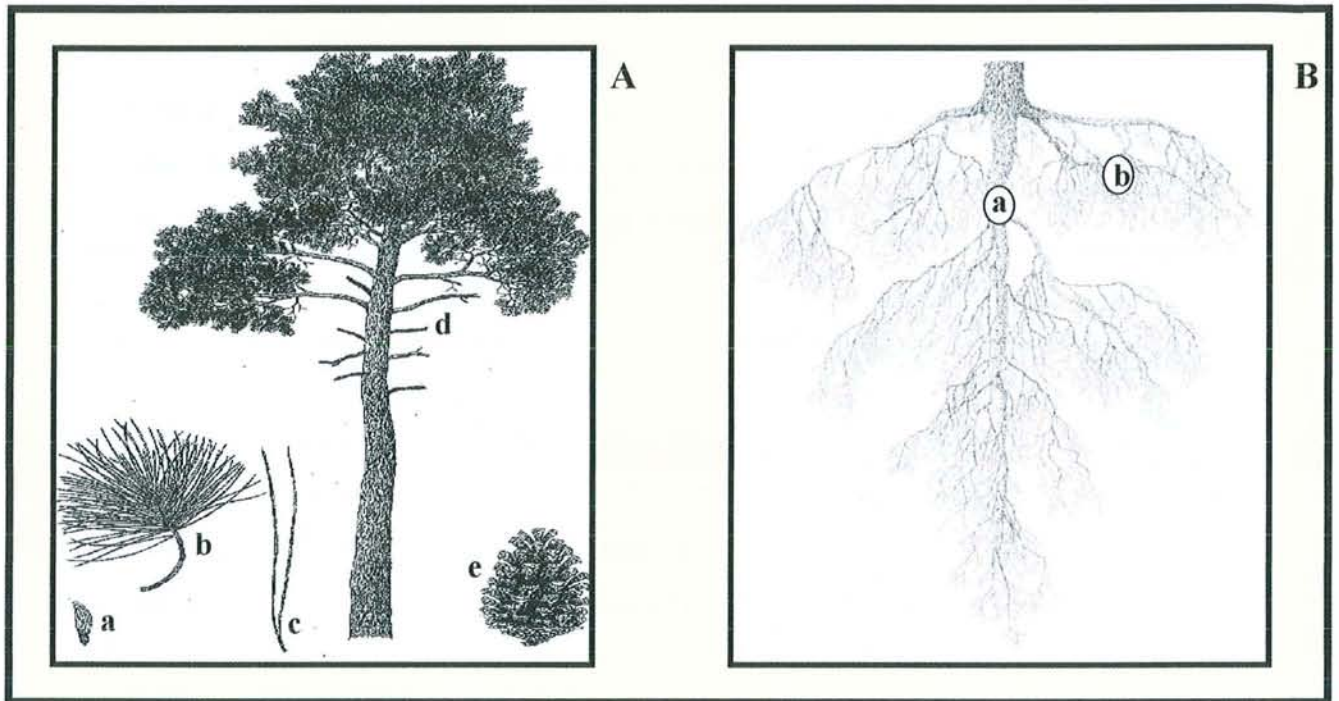
La France est l'un des pays les plus boisés de l'Union Européenne derrière la Suède et la Finlande. La forêt y couvre près de 14 millions d'hectares, soit le quart de la surface du pays, avec une expansion annuelle de 30 000 ha.

Le pin maritime représente à lui seul 10% de la surface forestière nationale, les autres 90% étant représentés par 136 espèces dont les principales sont le hêtre et les chênes sessile et pédonculé. Le pin maritime est donc une composante majeure de la sylviculture française. A plus grande échelle, c'est le conifère le plus utilisé en reboisement dans les pays du sud-ouest de l'Europe (Espagne, Portugal), où il représente près de 4 millions d'hectares (figure 3).

### 1. Origine

Les pins appartiennent au plus vieux genre de la famille des *Pinaceae*, apparu au mésozoïque entre -190 et -136 millions d'années (figure 4), sous des latitudes moyennes. Pendant le crétacé, de -136 à -65 millions d'années, le genre *Pinus* s'est différencié en 2 sous-genres correspondant aux *Strobus* et aux *Pinus*. Durant cette période, les pins colonisèrent tout l'hémisphère nord. Les changements climatiques qui se sont produits au cours de l'éocène (de -54 à -35 millions d'années) ont eu un impact à la fois sur la fragmentation et sur l'expansion des populations. En effet, une forte chute de la température et de l'humidité à la fin de cette période, a favorisé l'extension des pins dans les latitudes moyennes et a, de plus, conduit à l'émergence des angiospermes.

Des études basées sur l'analyse des fossiles ont montré que les pins se trouvaient en abondance, au cours du miocène (de -26 à -7 millions d'années), en Amérique du Nord, en Europe ainsi qu'en Asie. Les ancêtres directs des pins actuels proviennent de cette période.



**Figure 5** : Le pin maritime. **A)** Parties aériennes. **a** : graine ; **b** : aiguilles ; **c** : fascicule ; **d** : tronc et branches ; **e** : cône. **B)** système racinaire. **a** : racine plongeante ; **b** : racine traçante. D'après Farjon (1984).

## 2. Taxonomie

Le genre *Pinus* contient plus d'espèces que n'importe quel autre genre du groupe des conifères. Le sous-genre des *Pinus* (*Diploxylon*) est lui même subdivisé en sections et sous-sections. La position systématique du pin maritime (*Pinus pinaster* Ait. ou *Pinus maritima* Mill.) dans la classification actuelle est la suivante (d'après **Farjon, 1984**) :

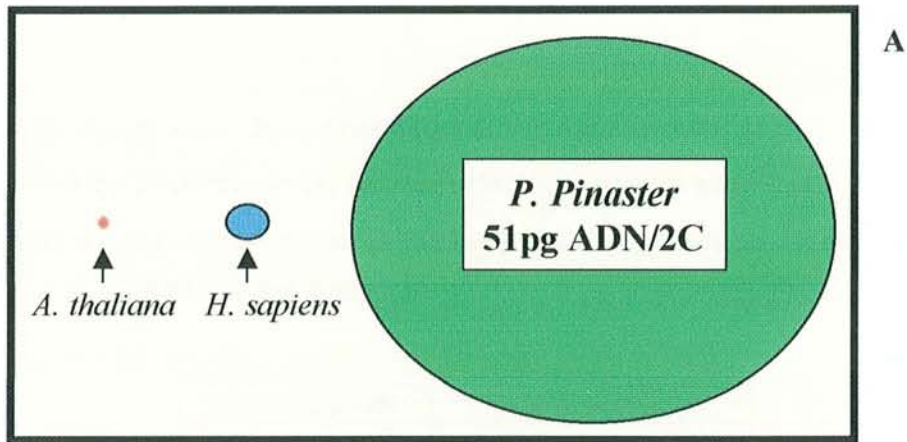
Embranchement	Phanérogames
Sous-embranchement	Gymnosperme
Ordre	Pinales
Famille	Pinacées
<b>Genre</b>	<b><i>Pinus</i></b>
Sous-Genre	Pinus
Section	Pinaster
Sous-sections	Australes
<b>Espèce</b>	<b><i>pinaster</i></b>

L'évolution du genre *Pinus* a récemment été étudiée à partir de différentes approches, basées notamment sur les marqueurs moléculaires. Certaines indications laissent à penser que les pins localisés en Méditerranée ont migré depuis l'Asie de l'Est le long des barrières montagneuses de l'Himalaya. Cependant, en se basant sur les divergences de séquences de régions chloroplastiques (faites pour les pins d'Eurasie), il apparaît que les provenances Méditerranéennes forment un groupe appartenant au sous-genre des *diploxylon*, au travers duquel on retrouve *P. pinaster*, *P. canariensis* et *P. pinea* (Wang et al., 1999).

## 3. Description biologique et habitat

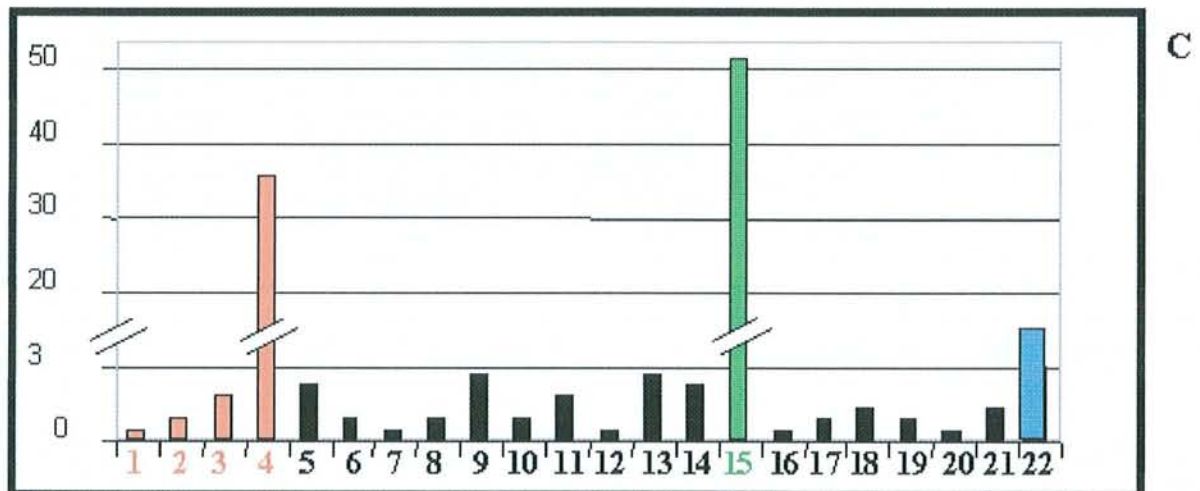
Le pin maritime est une espèce sempervirente à longévité moyenne, bien qu'il puisse atteindre les 200 ans. Dans la pratique sylvicole, on l'exploite entre 45 et 60 ans. Sa croissance est rapide et peut atteindre, à l'âge adulte, une taille comprise entre 20 et 35 mètres de haut.

Son tronc est flexueux à la base avec une écorce rougeâtre épaisse et crevassée. Son houppier est conique, étalé, et peu compact. Les aiguilles sont rigides. Elles présentent des stomates sur les deux faces et sont regroupées en fascicules de deux aiguilles, pouvant dépasser 15 à 20cm de long (figure 5.A.). Le système racinaire du pin maritime est double, traçant et plongeant (figure 5.B.).



B

n°	Espèce	ADN/2C (pg)	n°	Espèce	ADN/2C (pg)
1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	0,3	12	<i>Eucalyptus</i>	0,6
2	<i>Oryza sativa</i>	1	13	<i>Hedera helix</i>	2,95
3	<i>Solanum tuberosum</i>	1,75	14	<i>Ilex aquifolium</i>	2,3
4	<i>Triticum aestivum</i>	35,65	15	<i>Pinus pinaster</i>	51
5	<i>Acer pseudoplatanus</i>	2,35	16	<i>Prunus persica</i>	0,55
6	<i>Alnus glutinosa</i>	1,1	17	<i>Quercus sessilis</i>	1
7	<i>Betula populifolia</i>	0,4	18	<i>Quercus petraea</i>	1,6
8	<i>Corylus avellana</i>	0,95	19	<i>Rubus odoratus</i>	0,75
9	<i>Crataegus crusgalli</i>	2,75	20	<i>Salix elegantissima</i>	0,7
10	<i>Cytisus nigricans</i>	1,1	21	<i>Sorbus americana</i>	1,3
11	<i>Fraxinus excelsior</i>	1,9	22	<i>Homo sapiens</i>	6



**Figure 6 :** A): Comparaison schématique du contenu en ADN par cellule diploïde, entre le pin maritime, l'homme (6 pg ADN/2c) et l'arabette (0,3 pg ADN/2C) . B): Tableau récapitulatif du contenu en ADN par cellule diploïde pour différentes espèces végétales. C): Histogramme correspondant au tableau B.

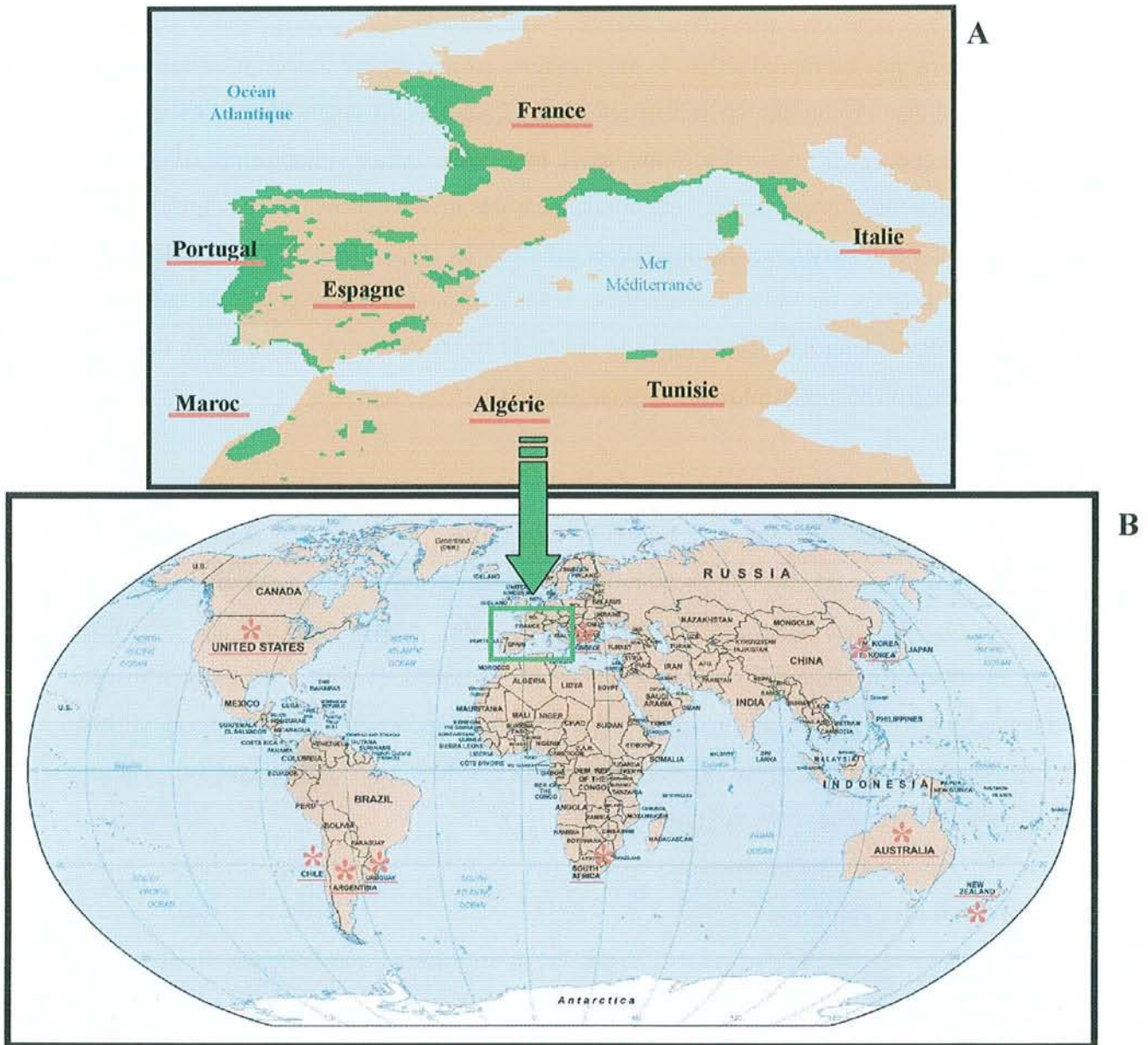
Sur le plan du régime de reproduction, le pin maritime est une espèce monoïque, allogame qui fleurit en avril/mai produisant un pollen abondant, à dispersion anémophile. Les cônelets, apparaissent précocement, entre 5 et 8 ans, pour former des cônes volumineux (10 à 18cm), faiblement pédonculés, bruns luisants qui contiennent des graines ailées (anémochorie). Sur le plan moléculaire, son caryotype est diploïde et présente 24 chromosomes ( $2n=2x=24$ , Saylor, 1964) métacentriques ou submétacentriques, comme chacune des espèces du genre. La quantité d'ADN contenu par cellule diploïde est de 51pg (A. Savouré, non publié), ce qui en fait un des plus gros génomes du règne végétal (figure 6).

Au niveau de son habitat, c'est un arbre qui s'adapte très bien sur un sol sableux, pauvre et acide (podzols, sables dunaires), tel que celui des Landes de Gascogne. Bien adapté aux climats maritimes très tempérés, à température douce et régulière, le pin maritime exige une légère humidité de l'air, beaucoup de lumière (héliophyle), mais il supporte une sécheresse estivale modérée. Cependant, il reste sensible aux fortes gelées, surtout pour les provenances Méditerranéennes. Enfin, le pin maritime possède de nombreux ennemis comme la chenille processionnaire, la pyrale du tronc (Kleinhentz, 1998), les cochenilles et certains champignons (Desprez-Loustau et Dupuis, 1994).

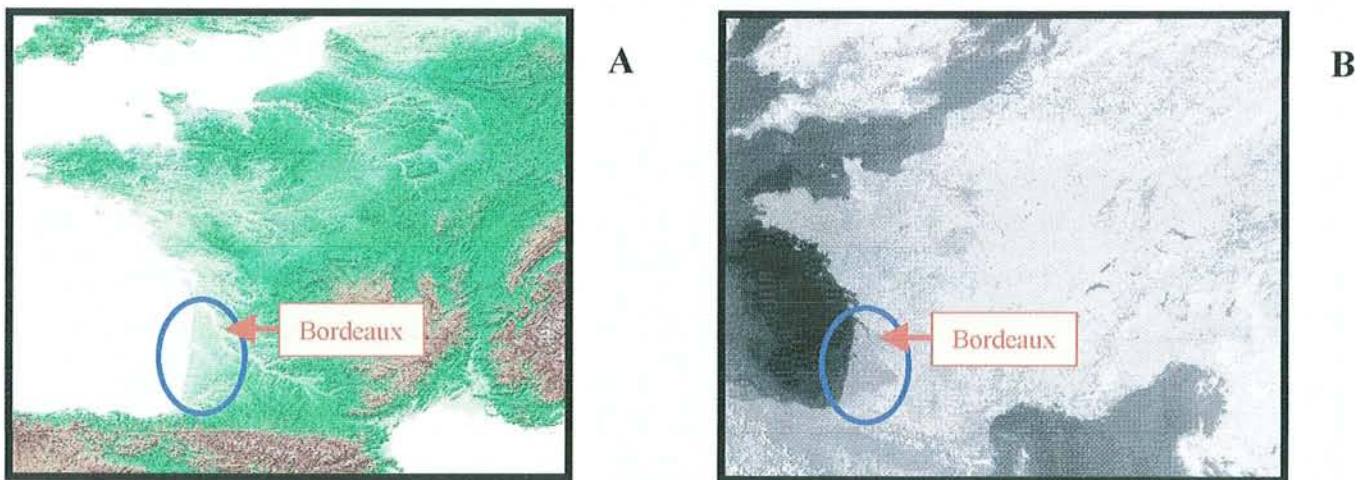
#### 4. Répartition géographique

Différentes études ont montré que les changements climatiques rencontrés en Europe au cours du quaternaire (de -2,4 millions d'années jusqu'à maintenant), ont joué un rôle majeur dans la distribution géographique et phylogénétique des plantes herbacées et des arbres (Taberlet et al., 1998). En effet, les périodes glaciaires et inter-glaciaires ont agi en diminuant ou en agrandissant leurs aires de répartition naturelles (Hewitt, 2000). Les oscillations successives entre ces périodes du pléistocène (de - 2,4 à -0,01 millions d'années) ont créé des îlots refuges, qui ont constitué la base génétique pour chaque recolonisation (Taberlet et al., 1998). Pour le pin maritime, sa distribution actuelle semble directement reliée à la dernière glaciation (de -0,7 à -0,01 million d'années, Baradat et Marpeau-Bezard, 1988). Cependant, la répartition géographique du pin maritime a été largement modifiée par la main de l'homme au cours des 150 dernières années (Le Maitre, 1998).

Le pin maritime est donc une espèce autochtone du bassin méditerranéen occidental et de la façade atlantique, entre les latitudes 31° et 46° nord et les longitudes 9° et 13° est. Bien que le



**Figure 7 :** A): Aire de répartition naturelle du pin maritime (■). B): Pays où le pin maritime a été introduit (\*).



**Figure 8 :** La forêt Landaise. A): Localisation géographique, B): Vue par satellite.



pin maritime nécessite un habitat bien caractéristique, c'est une espèce qui possède une aire naturelle de répartition très morcelée, aux régimes climatiques et aux caractéristiques pédologiques très diverses. En effet, l'aire naturelle du pin maritime s'étend du sud au nord, du Maghreb (Tunisie, Algérie et Maroc) à la Vendée (France) et d'ouest en est, du Portugal à l'Italie (figure 7.A.). Même si le pin maritime est une essence colonisatrice, son aire d'extension naturelle reste faible.

Cependant, le pin maritime a été introduit au Chili (100 000 ha), en Australie occidentale (50 000 ha), en Afrique du Sud (40 000 ha), en Argentine, en Nouvelle-Zélande (3 000 ha) et en Grèce (10 000 ha). Des tentatives d'introduction ont également été réalisées en Corée, Uruguay et aux Etats-Unis. Actuellement, le pin maritime est étendu sur une surface de 500 000 hectares en Australie de l'ouest sur des surfaces caractérisées par des sols salins (figure 7.B.).

Au niveau national, on le rencontre à l'état naturel dans le massif des Maures et de l'Estérel (Cévennes), dans les basses montagnes du Var et des Alpes-Maritimes, dans les Corbières ainsi qu'en Corse. Son aire de végétation a ensuite été étendue par plantation, principalement dans les Landes de Gascogne, puis tout le long de la façade Atlantique, des Pyrénées à la Bretagne (Poitou-Charentes, Vendée, Sarthe, Basse-Normandie). On le retrouve aussi dans la région Centre, notamment en forêt d'Orléans et en Sologne. La forêt Landaise représente environ 1 million d'hectares, répartis sur 3 départements : la Gironde, les Landes et le Lot-et-Garonne. Cette forêt est un bloc homogène de 200km du nord au sud et de 150km d'est en ouest (figure 8).

### **5. Poids économique**

Les Landes de Gascogne représentent actuellement l'un des plus grands massifs forestiers artificiels Européens. La mise en place d'une monoculture de pin maritime a débuté au milieu du siècle dernier (loi du 19 juin 1857) et s'est intensifiée après la seconde guerre mondiale modifiant profondément une région auparavant marécageuse et dotée d'une végétation basse et hydrophile (figure 9.A.).



A



B



C

**Figure 9 :** A): La lande à la fin du XIX<sup>e</sup> début du XX<sup>e</sup> siècle.  
B): Lande actuelle, recouverte de cultures de pin maritime.  
C): Différents types de matériaux fabriqués à partir du pin maritime.

De par l'intensification de la sylviculture et l'utilisation de techniques modernes, un accroissement considérable de la production ligneuse a été atteint ces 25 dernières années, qui correspond en moyenne à 9m<sup>3</sup>/ha/an contre 4,5 m<sup>3</sup>/ha/an au début des années 60 (figure 9.B.). Le pin maritime Landais représente la principale valorisation de l'ensemble écologique que constitue la lande humide. Il présente un intérêt économique indiscutable avec 30% de la production nationale de bois de résineux. Ses utilisations principales concernent la production de bois d'œuvre (parquets, lambris, moulures, meubles, contreplaqué, charpente et surtout palettes) et de bois d'industrie (pâte et papier, panneaux de particules ou de fibres, figure 9.C.). Enfin, 30 000 emplois sont directement liés à l'exploitation du pin maritime, générant un chiffre d'affaires d'environ 19 milliards de francs, équivalant à celui des vins de Bordeaux.

### **6. Programme d'amélioration génétique**

L'exploitation de variétés génétiquement améliorées doit permettre d'accroître encore cette productivité. Dans ce contexte, un programme de sélection a débuté au début des années 60. L'INRA a d'abord installé des tests de provenances correspondant à toute l'aire naturelle, dont l'étude a permis une description de la variabilité génétique de nombreux caractères comme la croissance (branchaison et forme du tronc ; Danjon, 1994), la résistance à la sécheresse (Guyon et Kremer, 1982), au froid (Bouvarel, 1960), aux insectes (Schvester et Ughetto, 1986) ou encore aux maladies (Desprez-Loustau et Dupuis, 1994).

La provenance Landaise étant la mieux adaptée à l'habitat landais, elle a été retenue pour lancer un programme d'amélioration génétique pour la région Aquitaine. C'est la provenance la plus vigoureuse et qui présente la meilleure résistance au froid. Afin de diminuer la sinuosité du tronc et les problèmes de branchaison de la provenance Landaise, la provenance Corse fut introduite dans un second temps dans le programme d'amélioration.

En 1995, un Groupement d'Intérêt Scientifique nommé «GIS Pin Maritime du Futur » a été formé afin de prendre en charge la sélection du pin maritime. Les acteurs du GIS sont représentés par l'INRA (Institut National de la Recherche Agronomique) et l'AFOCEL (Association Forêt Cellulose) pour la partie amélioration, et par l'ONF (Office National des Forêts) et le CPFPA (Centre de Productivité Forestière d'Aquitaine) pour les utilisateurs. Ce regroupement devrait aboutir à la création de variétés « à la carte ». Le gestionnaire forestier

pourra alors, à son gré, privilégier la production, la rectitude, la finesse des branches, la qualité du bois etc., ou trouver le meilleur compromis entre tous ces caractères.

### **7. Le stress hydrique : réponse moléculaire, génétique et physiologique du pin maritime.**

Les premiers travaux concernant la réponse du pin maritime face à un déficit d'alimentation en eau ont réellement débuté il y a un peu plus de 10 ans. Ces travaux avaient pour but de caractériser le comportement du pin maritime, au niveau physiologique.

Dans un premier temps, Nguyen et Lamant (1988) ont travaillé à partir de plantules correspondant à deux races géographiques bien distinctes, à savoir les races Landaise (faible tolérance à la sécheresse, forte croissance, France) et Tamjout, (tolérante, faible croissance, Maroc). Les expériences ont été réalisées en milieu hydroponique avec ou sans polyéthylèneglycol (PEG 600), sur de courtes périodes de stress (6 jours maximum) et une intensité comprise entre  $-0,03\text{MPa}$  (témoin) et  $-0,8\text{MPa}$  (stress). Les premières analyses ont porté sur les différences d'accumulation du D-pinitol (3-O-methyl-D-inositol) et du myo-inositol, entre ces deux provenances. Les auteurs ont montré tout d'abord que le niveau de pinitol était 2 à 3 fois plus élevé dans des conditions de bonne alimentation en eau pour la race Tamjout que pour la Landaise, tant au niveau des racines qu'au niveau des parties aériennes. L'accumulation du pinitol au cours du stress suit la même tendance chez ces deux provenances. Le myo-inositol quant à lui s'accumule seulement au niveau des racines de la race Tamjout. Au vu de ces résultats, ils semblerait que seul le myo-inositol interviendrait dans l'osmorégulation car seul ce composé s'accumule au niveau du cytoplasme. Pour ce qui est du pinitol, il pourrait intervenir au niveau de la protection des structures membranaires, cependant son rôle reste incertain. A partir du même matériel végétal, Nguyen et Lamant (1989a) ont aussi montré que la provenance Marocaine présentait une meilleure croissance racinaire en condition de stress. De plus, ils ont montré que l'ajustement osmotique se faisait de manière plus efficace pour la race marocaine. Ces études ont mis en évidence que le maintien de la turgescence racinaire jouait un rôle prépondérant dans la tolérance au stress hydrique chez le pin maritime, par le biais de l'osmorégulation. Cette osmorégulation a pour but de maintenir une forte différence de potentiel hydrique entre les racines et le sol, afin d'en extraire l'eau. Le maintien du potentiel osmotique est directement relié à l'accumulation dans les cellules de composés solubles. Enfin, il s'agissait de définir comment s'opérait cette osmorégulation. Pour cela, Nguyen et Lamant (1989b) ont utilisé des jeunes plants âgés de deux ans, correspondant aux deux mêmes provenances. Les travaux ont montré que

l'osmorégulation, et donc la tolérance des plants de la race Tamjout, provenaient d'une accumulation au niveau racinaire d'ion potassium ( $K^+$ ) dans le cytoplasme. Une expérience complémentaire (Nguyen-Queyrens et al., 1995) a été réalisée en stress salin ( $NaCl$ , de 0 à 150mM) sur des plants âgés de un mois, pendant 10 jours. L'analyse du bilan ionique ( $Na^+$  et  $K^+$ ) a permis de montrer que les plants tolérants avaient une forte sélectivité pour le  $K^+$  au dépend du  $Na^+$ . Cette sélectivité leur permettait de maintenir leur croissance et ainsi de retarder l'effet toxique du  $Na^+$  par dilution de ce cation.

Ces recherches ont donc mis en évidence l'importance du système racinaire dans l'adaptation du pin maritime face à la sécheresse. Cependant, bien que ces résultats apportent des indications sur les mécanismes liés à la tolérance à un déficit d'alimentation en eau, ils restent difficilement exploitables pour le sélectionneur forestier qui doit certes tenir compte de la tolérance, mais dont le but est aussi de conserver une forte productivité.

Récemment des approches plus intégrées (génétique, physiologique et moléculaire ) ont été initiées (figure 2).

La première étude s'est focalisée sur l'identification et la caractérisation de protéines candidates ainsi que sur l'étude du déterminisme génétique de la quantité de protéines de stress (détection de PQL : Protein Quantity Loci) couplées à la détection de QTL pour les composantes physiologiques de la réponse au stress hydrique. Cette approche intégrée a été réalisée au cours de la thèse de Paulo Costa (1999). Le matériel utilisé était une descendance F2 de 200 plants âgés de deux ans (Corse x Landais), à partir de laquelle une carte génétique saturée a été construite. Un stress progressif a été appliqué aux 200 plants par simple arrêt d'arrosage pendant six semaines. Ce type de stress mimait assez bien le déficit hydrique subi pendant la période estivale, mais ne permettait pas un contrôle précis de l'état hydrique du milieu.

Dans un premier temps, Costa (1999) a étudié le protéome de 114 arbres, pris au hasard parmi les 200 descendants, en utilisant l'électrophorèse bidimensionnelle des protéines extraites d'aiguilles des plants avant et après six semaines de stress hydrique. 163 protéines (spots) ont été étudiées dont 45 d'entre elles ont été caractérisées par microséquençage interne (Costa et al., 1998 et 1999). 73% des protéines (120 spots) ont montré une réponse au stress, dont 62,5% (75 spots) étaient sous-exprimées et 37,5% (45 spots) sur-exprimées. La première

catégorie comprenait des protéines impliquées dans la régulation de la photosynthèse, dans le métabolisme du carbone, de l'azote, ainsi que des protéines chaperonnes ou l'actine. La seconde classe comprenait des protéines impliquées dans la biosynthèse des lignines, les phénomènes de défense systémique ou dans la détoxification, ainsi que des protéines de choc thermique ou induites par l'auxine.

En parallèle, une analyse simultanée de l'expression des protéines a été menée, et a permis d'obtenir une image synthétique des relations entre protéines, sur la base de leur niveau d'expression dans les 228 échantillons. Deux grands groupes sont ressortis de cette analyse, l'un comprenant les protéines dont l'accumulation diminue, l'autre comprenant les protéines dont l'accumulation augmente entre les deux conditions. A l'intérieur de chacun de ces groupes, des sous-groupes de protéines présentant des « homologues de régulation » ont été identifiés. Un sous-groupe intéressant comprenait six variables (potentiel hydrique de base, teneur relative en eau, conductance stomatique, taux de photosynthèse maximum, transpiration, consommation en eau) physiologiques auxquelles se rattachaient des protéines de fonction hélas inconnue, et dont la quantité diminuait dans la condition stressée, montrant une implication possible de ces protéines dans la réponse au stress.

Disposant de la quantité des 163 protéines sur les 114 plants F2, pour les deux conditions, une recherche de PQL a été réalisée. Des PQL ont été trouvés et localisés sur la carte génétique pour 75% des protéines. Ils étaient distribués sur l'ensemble du génome. Cependant, peu de PQL ont été détectés pour chaque protéine (deux en moyenne) mais leurs coefficients de détermination étaient relativement élevés (~15%). Par ailleurs, pour une protéine donnée, les PQL détectés en condition de bonne alimentation en eau, étaient presque toujours différents de ceux détectés en condition de stress. Ces résultats indiquent que la régulation et l'expression des gènes, en condition de croissance normale ou en condition de stress, sont contrôlées par des facteurs génétiques différents. Enfin, des QTL ont été cartographiés pour un ensemble de caractères décrivant les comportements hydriques (potentiel hydrique de base, consommation en eau, potentiel osmotique de base, teneur relative en eau) et les échanges gazeux (conductance stomatique, transpiration, photosynthèse maximale, discrimination isotopique du carbone) avant et toutes les semaines au cours du stress. Des mesures de croissance en hauteur, biomasses aériennes et racinaires, ainsi que des analyses minérales (N, P, K) sont venues compléter ces mesures.

Les analyses ont mis en évidence peu de QTL (49 QTL pour 36 variables), à effets relativement faibles, mais localisés essentiellement dans trois régions du génome. De cette analyse des QTL, on pourra citer par exemple les résultats relatifs à la discrimination isotopique du carbone, montrant la localisation de deux QTL sur le groupe de liaison numéro six qui expliquent 16,3% de la variation phénotypique totale. Cette mesure est très intéressante car elle est directement reliée à l'efficacité d'utilisation de l'eau. C'est-à-dire à la quantité d'eau utilisée par rapport à la biomasse produite. La discrimination isotopique du carbone peut donc être reliée au phénomène de croissance, notamment lors d'un stress hydrique. Ces résultats sont en accord avec les résultats obtenus dans un autre pedigree (202 arbres d'une famille de plein-frères âgés de 16 ans), où quatre QTL expliquant collectivement 40% de la variation phénotypique ont été détectés (Brendel et al., communication personnelle).

Cette étude était la seconde, après celle de Damerval et al. (1994), à montrer l'existence des gènes « régulateurs » de l'expression génétique contrôlant l'accumulation de protéines. L'accumulation d'une protéine intègre les étapes de transcription, traduction, modification post-traductionnelle et turnover, et il est tentant d'imaginer que ces facteurs génétiques (PQL) puissent également correspondre à ceux qui interviennent dans l'expression d'un caractère (QTL). Si la variation d'un caractère quantitatif dépend partiellement de la quantité d'une protéine, alors le facteur génétique qui contrôle la quantité de cette protéine devrait également causer une variation du caractère. Ainsi, PQL et QTL devraient coïncider sur une carte génétique. Dans les trois « points chauds » au niveau desquels se regroupent la plupart des QTL, de nombreux PQL ont été détectés. Cependant, sans exclure un rôle biologique de certains d'entre eux dans la réalisation du caractère, il convient de rappeler que les PQL sont distribués sur tout le génome, et qu'une colocalisation devait « forcément » être observée, simplement par hasard. La recherche de colocalisations multiples entre les QTL d'un caractère et les PQL d'une protéine (de Vienne et al., 1999) et la caractérisation fonctionnelle des protéines sont autant d'éléments qui permettront d'établir un lien entre la protéine et le caractère, et de voir si la variation de la quantité de la protéine n'est pas neutre par rapport au caractère quantitatif.

Suite à ces résultats encourageants, nous avons continué dans le cadre de cette thèse à développer cette approche intégrée, en combinant cette fois-ci les variations observées au niveau des ARN messagers avec celles observées au niveau protéique, tout en continuant en

parallèle les analyses physiologiques. Au niveau tissulaire, nous nous sommes intéressés à la fois aux aiguilles, siège de la photosynthèse, et au système racinaire, siège de l'assimilation en eau et de la régulation osmotique.



S.C.D. - U.H.P. NANCY 1  
BIBLIOTHEQUE DES SCIENCES  
Rue du Jardin Botanique  
54600 VILLERS-LES-NANCY

**II. La génomique structurale et fonctionnelle :  
méthodes et applications**

### Introduction

Depuis plus de 50 ans, de nombreuses données ont été accumulées quant au fonctionnement des organismes vivants. Bien avant la publication de la structure en double hélice de l'ADN par Watson et Crick (1953), les bases de la conservation de l'information et de son transfert en unités fonctionnelles (protéines) étaient déjà connues. L'ADN ayant été reconnu comme étant le matériel génétique de tout être vivant en 1944, et l'année suivante comme codant pour des protéines. Depuis, les principales voies métaboliques ont été décrites et ont ouvert la porte à la découverte et à la compréhension des mécanismes biochimiques qui régissent l'organisation et le fonctionnement de la cellule.

Cependant, l'appréhension des phénomènes aussi complexes que la croissance, le développement ou l'adaptation à différents stimuli (par exemple un stress hydrique) d'un organisme nécessite la mise en oeuvre d'outils permettant une étude globale de l'expression des gènes et des protéines. Une étude intégrée du génome permet d'en extraire toute l'information qu'il contient, et ainsi de décoder la dynamique de son fonctionnement et de sa régulation.

La première étape d'une telle étude consiste à obtenir la totalité de l'information génétique, ce qui implique un séquençage systématique de l'ADN génomique. De nombreux projets internationaux ont vu le jour depuis une dizaine d'années pour acquérir l'ensemble des séquences nucléotidiques de certains organismes. Depuis 1995, lorsque le premier génome a été complètement séquencé (*Haemophilus influenzae*, Fleischmann et al., 1995), l'essor de la génomique structurale a été immense. Bientôt la totalité des séquences d'ADN génomique sera disponible pour différentes espèces de plantes. Déjà, les programmes de séquençage total des génomes de l'arabette (*Arabidopsis thaliana*) et du riz (*Oryza sativa*) touchent à leur fin (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000 - Sasaki et Burr, 2000).

Une autre partie de la génomique structurale s'intéresse plus précisément aux transcrits provenant des parties codantes de l'ADN génomique. Dans ce cas le but est d'identifier l'ensemble des transcrits (transcriptome) existant au sein d'un organisme dans différents états physiologiques.

**Tableau 1** : Liste des organismes pour lesquels la totalité du génome à été séquencé.

<b>Espèce</b>	<b>Paires de bases séquencées</b>	<b>Auteurs</b>
<i>Haemophilus influenzae</i>	1 830 138	Fleischmann et al., 1995
<i>Bacillus subtilis</i>	4 214 814	Kunst et al., 1997
<i>Borrelia burgdorferi</i>	910 724	Fraser et al., 1997
<i>Escherichia coli</i>	4 639 221	Blattner et al., 1997
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	4 411 529	Cole et al., 1998
<i>Treponema pallidum</i>	1 138 011	Fraser et al., 1998
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	1 230 230	Kalman et al., 1998
<i>Neisseria meningitidis</i>	2 272 351	Tettelin et al., 2000
<i>Vibrio cholerae</i>	4 033 460	Heidelberg et al., 2000
<i>Caulobacter crescentus</i>	4 016 942	Nierman et al., 2001
<i>Escherichia coli</i> (enterohemorrhagic)	5 500 000	Hayashi et al., 2001
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	12 142 471	Goffeau et al., 1996
<i>Caenorhabditis elegans</i>	86 348 653	The C. elegans Genome Consortium, 1999
<i>Arabidopsis thaliana</i>	115 000 000	The Arabidopsis Genome Initiative., 2000
<i>Homo sapiens</i> *	2 910 000 000	Venter et al., 2001

\* reste 5% du génome à séquencer.

Cependant la compréhension du fonctionnement des organismes vivants nécessite non seulement la connaissance du support de l'information (génomique structurale), mais aussi de déchiffrer comment cette information est utilisée et régulée. La génomique structurale, qui s'intéresse à l'acquisition de séquences d'ADN dans son ensemble, et la génomique fonctionnelle qui vise à étudier les variations d'expression des séquences codantes, sont ainsi devenues les deux piliers de la biologie moléculaire.

Ces disciplines ont pu voir le jour et prendre de l'ampleur grâce aux avancées simultanées faites en biologie moléculaire (PCR, développement des vecteurs de clonage), au niveau technologique (séquenceur, réseaux d'ADN), mais aussi en bio-informatique (création de bases de données, développement des logiciels de traitement et d'analyse de séquences et de logiciels d'analyse d'images).

### 1. La génomique structurale

#### 1.1. Le séquençage systématique

Le principe de la génomique structurale repose sur l'acquisition systématique de l'enchaînement nucléotidique qui compose le génome d'un organisme vivant. Chez les eucaryotes, le séquençage systématique a débuté en 1989 avec le projet du génome humain (*Homo sapiens*), actuellement en phase terminale (Venter et al., 2001 – Lander et al., 2001). Depuis, d'autres projets ont vu le jour, que ce soit pour des virus, des bactéries ou encore des eucaryotes (tableau 1). Ces organismes sont caractérisés par la petite taille de leur génome et/ou le fait qu'ils correspondent à des espèces modèles comme *C. elegans* ou *A. thaliana* ou bien encore parce qu'ils présentent un intérêt économique pour les industries agro-pharmaceutiques (*Vibrio cholerae*, Heidelberg et al., 2000).

En pratique, il s'agit de séquencer des fragments d'ADN d'une longueur avoisinant les 1000pb, jusqu'à ce que le génome soit totalement couvert. Pour ce faire, les génomes sont tout d'abord cartographiés : cartographie physique. Cette étape de cartographie physique est réalisée après digestion enzymatique de la totalité du génome à l'aide d'enzyme de restriction. Les fragments d'ADN doivent être de grande taille pour faciliter leur ordonnancement, et sont obtenus soit par digestion partielle, soit en utilisant des enzymes à faible fréquence de coupure (*NotI*, *MluI*). Il existe différentes méthodes de cartographie physique, qui passent ou non par

le clonage proprement dit des fragments. Cependant, seule la combinaison de plusieurs techniques permet d'obtenir une carte globale.

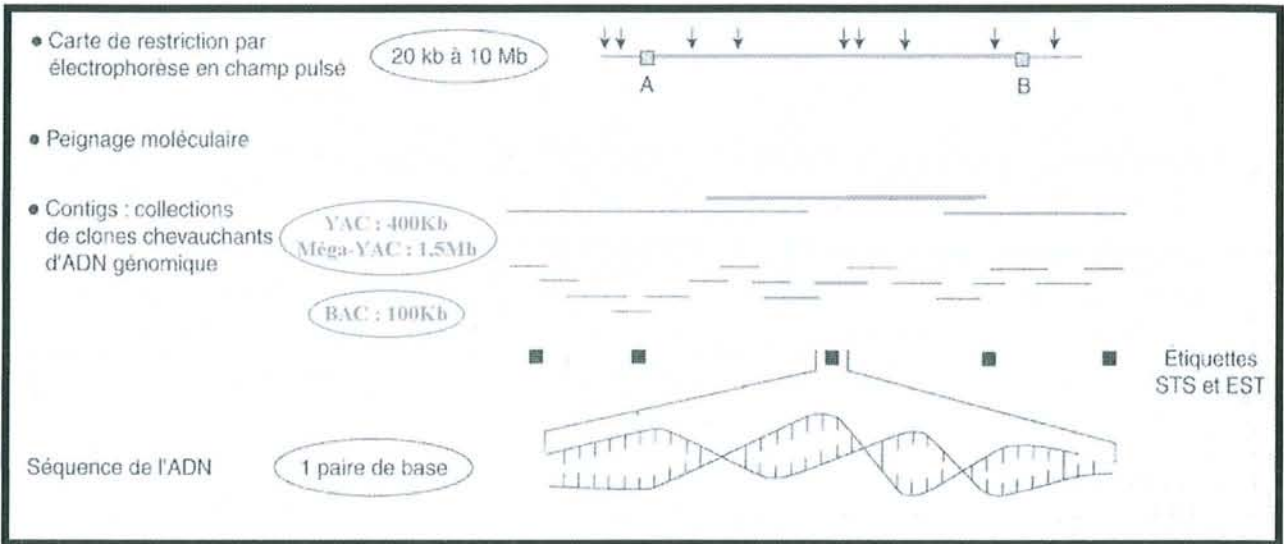
La première méthode consiste à séparer les fragments de digestion sur gel d'électrophorèse en champ pulsé (PFGE : Pulse Field Gel Electrophoresis). Cette technique permet de séparer des fragments de 20Kb à 10Mb (Yerle, 2000). L'utilisation de deux marqueurs nucléotidiques comme sonde pour hybrider sur ces fragments de digestion permet de conclure à la syntenie des deux marqueurs et d'estimer la distance en nombre de nucléotides. Au final, on obtient une carte moléculaire très précise sur laquelle les marqueurs nucléotidiques sont placés physiquement les uns par rapport aux autres.

Une deuxième méthode consiste en l'alignement de clones chevauchants pour former des groupes appelés « contigs » (Chumakov et al., 1995). Les fragments d'ADN génomique obtenus lors de la digestion sont transférés dans des vecteurs capables de contenir de gros fragments d'ADN (Rogel-Gaillard, 2000) tels les BAC (Bacterial Artificial Chromosom, 100Kb), les YAC (Yeast Artificial Chromosom, 400Kb) ou bien encore les Mega-YAC (1,5Mb). Pour ordonner les clones, différentes méthodes sont alors disponibles :

La plus couramment utilisée est la méthode dite de « fingerprinting ». Elle consiste à réaliser des profils de digestion, avec deux ou trois enzymes de restriction, pour chacun des vecteurs. Les vecteurs sont ensuite ordonnés les uns par rapport aux autres en fonction de leurs profils de digestion. Cette méthode permet de déterminer les fragments communs et donc les zones de chevauchement (Cribiu et Schibler, 2000).

L'hybridation de marqueurs déjà positionnés sur des cartes génétiques, sur les différents vecteurs, est aussi utilisée pour les orienter par rapport aux chromosomes.

Une troisième méthode, appelée peignage moléculaire (Michalet et al., 1997), consiste à fixer de façon covalente des fragments d'ADN sur un support solide, et de les étirer par capillarité afin de les linéariser. Il s'agit ensuite de réaliser des hybridations avec d'autres séquences nucléotidiques et d'ordonner ces fragments les uns par rapport aux autres. C'est une technique très performante avec un fort pouvoir de résolution, malgré la complexité de sa mise en oeuvre.



**Figure 10 :** Cartographie physique, d'après Yerle (2000).

Une fois orientés les uns par rapport aux autres, les fragments d'ADN génomique sont à leur tour digérés. Les fragments de digestion sont finalement sous clonés dans des vecteurs plasmidiques en vue du séquençage proprement dit (figure 10, d'après Yerle, 2000). Pour éviter au maximum les erreurs liées au séquençage (une erreur tous les 10Kb), chaque clone est séquencé dans les deux sens, plusieurs fois d'affilée, pour obtenir au final une fiabilité 99,9% dans la séquence (99,96% chez l'homme, Venter et al., 2001). Tout ce travail est très long et fastidieux, et fait appel à de nombreux logiciels pour l'ordonnement des clones et l'analyse des séquences.

Dans le cadre du séquençage du génome d'*A. thaliana*, les auteurs ont procédé de la façon suivante (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000). Après avoir fractionné l'ADN génomique, celui-ci a été cloné dans des BAC, des TAC (Transformation-competent Artificial Chromosom), des YAC, des phages ainsi que dans des cosmides. Ces différents vecteurs ont ensuite été regroupés en « contigs ». La première phase de ce regroupement a consisté à séquencer 79 clones cosmidiqes afin d'avoir des jeux de séquences pour l'ancrage d'autres séquences et l'ordonnement des différents clones. Une carte physique pour les BAC a parallèlement été établie par profil de restriction ou par PCR pour des fragments correspondant à des STS (Sequence Tagged Sites). Cette carte physique a ensuite été intégrée à la carte génétique afin d'établir une base pour la couverture du génome par les différents « contigs ». Les « contigs » ont été ensuite étendus par séquençage des extrémités de 47 788 BAC. Au final 10 « contigs » représentant les bras chromosomiques et les régions centromériques ont été assemblés à partir de 1569 BAC, TAC, cosmides ou phages. L'utilisation combinée des profils de restriction et du séquençage des extrémités des BAC étant généralement une solution adéquate pour le séquençage des clones couvrant l'ensemble du génome. Cependant, 22 produits PCR ont aussi été amplifiés directement à partir de l'ADN génomique afin de couvrir des zones non clonées. Enfin, les séquences télomériques ont été obtenues à partir de YAC ou de phages spécifiques, par PCR inverse, due au motifs nucléotidiques répétés qui sont difficilement séquençables. Au final, après séquençage dans les deux sens des 125Mb du génome d'*Arabidopsis*, et comparaison des séquences chevauchantes entre les différents clones, les auteurs ont déterminé que la fiabilité des séquences obtenues était comprise entre 99,99 et 99,999%.

Une fois la phase de séquençage terminée, un tout autre travail non moins délicat reste à réaliser. Il correspond à l'analyse des séquences obtenues afin de déterminer la position des

gènes et de caractériser leurs produits. Cette analyse correspond à l'annotation des séquences qui se subdivise elle-même en deux sous-étapes : « l'annotation structurale » et « l'annotation fonctionnelle » (Rouzé et al., 1999). L'annotation structurale a pour but de différencier l'ADN codant du non codant. Pour cela, deux techniques sont principalement utilisées :

La première méthode consiste en l'utilisation de logiciels basés sur la fréquence d'apparition de certains motifs hexamériques ou plus simplement sur la teneur en guanine et cytosine d'une séquence donnée (Uberbacher et Mural, 1991 – Hebsgaard et al., 1996 – Tolstrup et al., 1997). Pour définir la structure des gènes d'*Arabidopsis*, les algorithmes utilisés ont été optimisés en fonction des séquences disponibles pour les gènes de fonctions connues ou pour les EST de cette même espèce (The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000). A partir de là, les gènes déterminés par ces algorithmes sont comparés sur des bases de données pour rechercher des correspondances avec des gènes de fonctions connues et/ou des EST.

La deuxième technique consiste à séquencer le génome d'un organisme proche, qui servira de référence. Cet organisme de référence doit avoir la particularité de posséder peu ou pas d'intron et de séquences inter-géniques. Dans le cas du séquençage humain, il s'agit d'un poisson possédant le même nombre de chromosomes, nommé « zebrafish » (*Danio rerio*). La comparaison du génome du « zebrafish » avec celui de l'homme a montré l'origine commune des chromosomes chez les vertébrés. Ces travaux ont aussi mis en évidence que les blocs dans lesquels se trouvent les gènes (« cluster ») restent conservés (synténie), bien que l'ordre des gènes (colinéarité) soit variable (Postlethwait et al., 2000).

La seconde étape correspond à « l'annotation fonctionnelle ». Elle consiste à accumuler et à ordonner les données disponibles au niveau de l'information biologique (espèce, source, gène, produit du gène, domaine et fonction) pour chacun des gènes isolés. Ces données sont ensuite rassemblées dans des bases de données. En fait, il est généralement possible de déterminer la fonction moléculaire mais rarement la fonction biologique. L'information sur la fonction de la protéine peut être déterminée par comparaison de séquences, par alignements multiples, par recherche de domaines ou de motifs particuliers (localisation intracellulaire), ou bien encore par prédiction de structure. Là encore de nombreux logiciels ont été développés, et sont présentés dans la revue de Bork et al., (1998). Cependant, il est nécessaire d'émettre des



réserves car ces données ne sont qu'une première approche de la caractérisation des séquences, et sont fortement corrélées à l'étape d'annotation structurale. C'est pourquoi des erreurs sont possibles. Elles ne peuvent être évitées qu'en étudiant les séquences une par une, ce qui correspond à un effort aussi important que le séquençage.

Dans le cas des plantes, les logiciels utilisés présentent certains biais car ils sont dérivés de ceux mis au point dans le cadre du séquençage du génome humain. Les problèmes rencontrés sont directement liés au peu d'information dont on dispose chez les plantes. En clair, les séquences les plus fortement exprimées sont toujours repérées contrairement à celles qui correspondent aux gènes faiblement exprimés, aux ARN codants pour des tRNA, aux introns rares, aux promoteurs ou bien encore aux régions contrôlant la transcription et la traduction. Cependant, le statut du génome d'*Arabidopsis* va changer avec la mise à disposition de données d'expression (Bouchez et Höfte., 1998). De plus, le séquençage du génome du riz permettra de valider et d'améliorer l'annotation des gènes, notamment pour les gènes communs aux deux espèces (Sasaki et Burr, 2000). Cet effort d'annotation réside donc dans la capacité à regrouper les données provenant de toute la communauté scientifique.

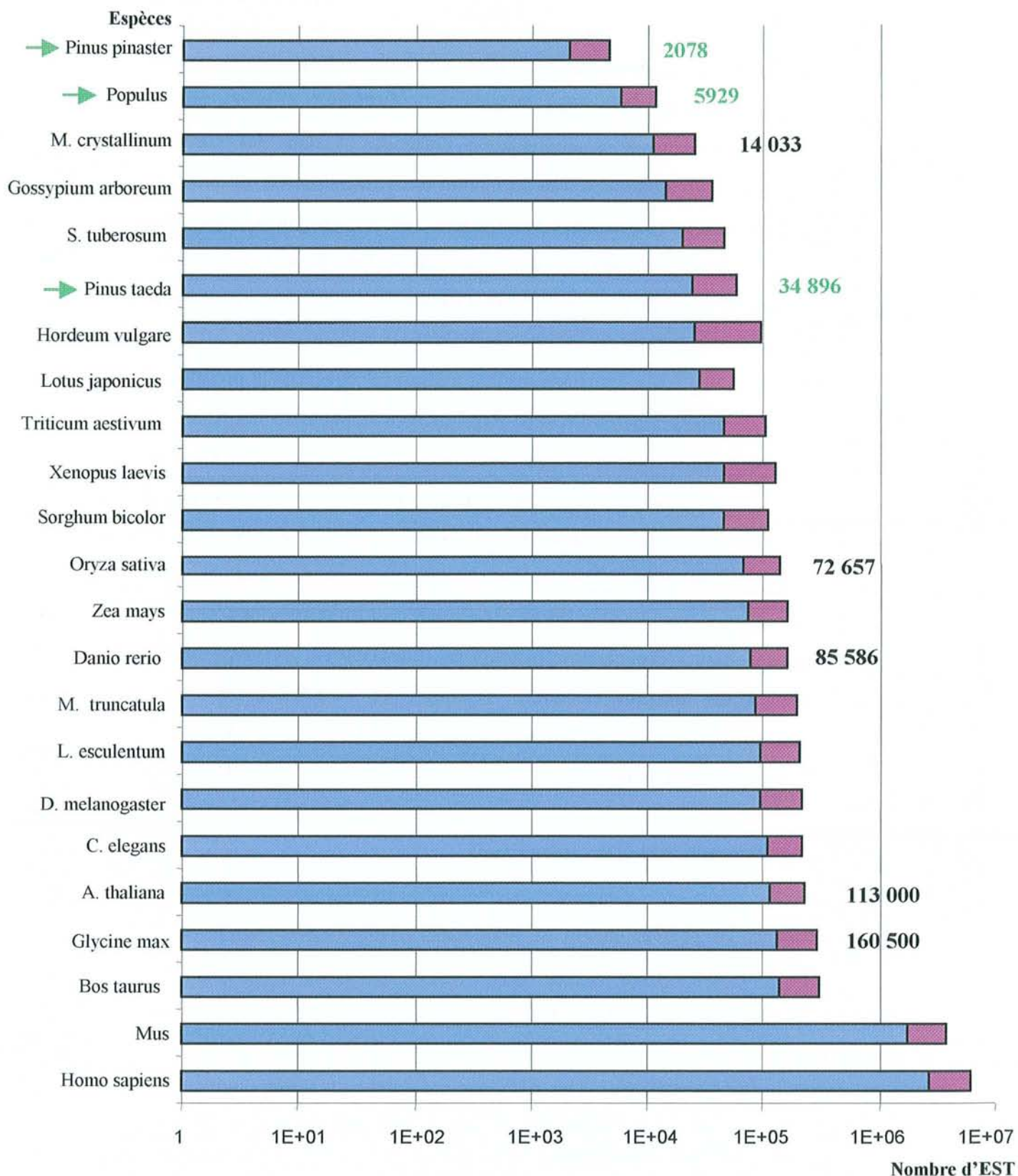
Une fois ce travail de séquençage et d'annotation terminé, on dispose d'un outil que l'on peut assimiler à une carte où sont localisés les différents types d'ADN, codant et non codant. A partir de là, il est possible de définir le nombre, la fonction (probable) ainsi que l'organisation des gènes, et de déterminer comment ils ont évolué. Des modèles plus larges d'organisation des génomes, transposables à d'autres espèces peuvent être aussi déduits de la comparaison des différentes cartes physiques ainsi établies comme nous l'avons vu précédemment entre l'homme et le « zebrafish » (Postlethwait et al., 2000).

Dans le cadre du séquençage complet du génome d'*Arabidopsis*, les auteurs (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000) ont défini la présence de 25 498 gènes, chiffre bien plus élevé que pour *C. elegans* ou la drosophile avec 19 099 et 13 601 gènes, respectivement. Ces 25 498 gènes codent pour 11 601 types de protéines différentes, parmi lesquelles 35% correspondent à des protéines uniques et 37,4% appartiennent à des familles qui ont plus de cinq membres. Si on regarde plus en détail, 70% des gènes ont une fonction qui leur a été attribuée par comparaison de séquence (tous types d'organismes), les 30% restants étant de fonction inconnue. Cependant, seulement 9% des gènes de fonction connue ont été caractérisés expérimentalement. On constate aussi que les grands groupes de fonction restent conservés

entre eucaryotes, bien que les relations géniques entre eucaryotes pluricellulaires (plantes et animaux) restent plus étroites qu'entre pluricellulaires et unicellulaires (levure), notamment pour les gènes impliqués dans la communication cellulaire et dans les cascades de transduction. Cependant, si on s'intéresse à la régulation de la transcription, on constate que seulement 8 à 23% des gènes impliqués chez *Arabidopsis* ont des équivalents chez les autres eucaryotes (animaux ou levure) *a contrario* des gènes intervenant dans la traduction (48 à 60%). Ce résultat peut se traduire par une évolution différente des facteurs de transcription appartenant aux plantes (régulation spécifique) contrairement aux mécanismes de synthèse des protéines qui restent conservés. Un autre résultat intéressant concerne la présence élevée chez *Arabidopsis* de domaines répétés Pro-Pro-Arg qui sont notamment impliqués dans la stabilisation des ARN. D'autres domaines sont aussi très abondants tels que les domaines spécifiques des protéines kinases, de résistance aux maladies ou de reconnaissance de pathogènes. La sur-abondance de ces domaines particuliers suggère que les cascades de transduction en réponse aux pathogènes ou aux variations environnementales sont plus abondantes chez les plantes que chez les autres organismes. Au total, ce sont 150 familles de protéines qui sont spécifiques des plantes (facteurs de transcription, protéines structurales, enzymes et protéines de fonction inconnue). L'analyse et l'annotation des séquences d'*Arabidopsis* montrent donc la nécessité d'une espèce modèle pour le règne végétal compte tenu des différences qui existent entre le règne animal et le règne végétal.

### 1.2. Séquençage d'EST (Expressed Sequence Tag)

Comme nous l'avons vu précédemment, le séquençage systématique n'est pas forcément réalisable et informatif selon l'espèce que l'on étudie et le type d'information que l'on recherche. Si on s'intéresse à l'identification de gènes candidats influençant un caractère d'intérêt, on peut se contenter d'une approche basée sur les ADN complémentaires (ADNc), copies des ARN messagers (ARNm). Les ARNm représentent un faible pourcentage de la population des ARN totaux (1 à 3% chez les eucaryotes), et sont dépourvus à la fois d'introns et de séquences intergéniques. De plus, les ARNm codent généralement (excepté pour les pseudogènes ou les ribosymes ; Erdmann et al., 1999) pour des protéines exprimées dans les différents tissus ou cellules, d'un état physiologique particulier.



**Figure 11** : Nombre d'EST séquencées en fonction de l'espèce, d'après l'URL : [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/dbEST\\_summary.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/dbEST_summary.html). → ) : Arbres forestiers. □ ) : Recherche effectuée le 31/12/2000. ■ ) : Recherche effectuée le 07/04/2001.

C'est pourquoi une voie parallèle au séquençage systématique des génomes a été développée, afin d'obtenir de nombreuses séquences codantes appelées EST (Expressed Sequence Tag) ou étiquettes de séquences exprimées.

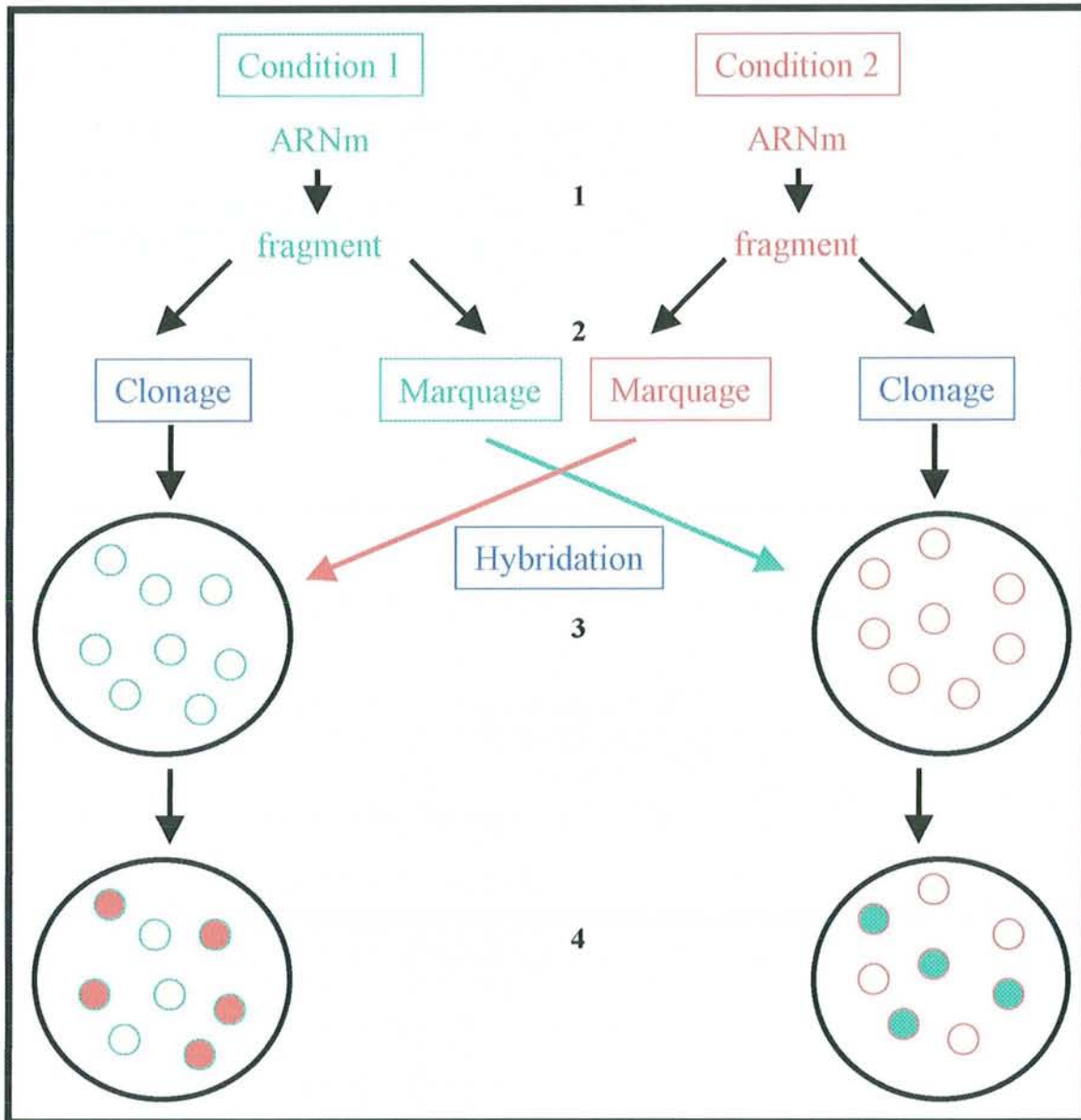
Cette technique est facilement utilisable sur tous les organismes vivants indépendamment de la taille de leur génome, et est largement utilisée que ce soit au niveau des procaryotes ou des eucaryotes (figure 11, Asamizu et al., 1999 - Asamizu et al., 2000).

Cette technique présente donc un intérêt pour le pin maritime.

En pratique, les ADNc, issus de la rétrotranscription des ARNm, sont clonés dans des vecteurs plasmidiques. L'ensemble de ces différents clones forme une banque d'ADNc. Des clones sont ensuite prélevés de manière aléatoire et partiellement séquencés sur l'une des extrémités (3'- ou 5'-terminales). Une fois qu'un grand nombre de séquences est disponible, il est possible de les classer en groupe de séquences correspondant au même gène ou « contig ». Dans certains cas, il est possible d'obtenir la totalité de la séquence d'un gène particulier par chevauchement de différents clones.

Chez les arbres forestiers, cette approche a été utilisée pour déterminer les populations de transcrits préférentiellement exprimés dans le xylème de pin à encens (*Pinus taeda*, Allona et al., 1998) et chez le peuplier (*Populus trichocarpa* et *P. tremula* x *P. tremuloides*, Sterky, 1998). Cependant, si on ne cherche pas à analyser les différences d'expression entre les gènes (« northern *in silico* »), il est utile de normaliser les banques.

La normalisation (Soares et al., 1994) consiste en l'élimination des clones redondants, c'est-à-dire correspondant au même gène, afin de gommer les différences de niveaux d'expression. Chacun des clones d'une banque normalisée apparaît avec la même fréquence, et donc la même probabilité d'être séquencé. Dans le cas de la normalisation, on perd de l'information au niveau de la fréquence d'apparition d'un clone donné (« northern *in silico* »), mais on en gagne au niveau du nombre de gènes différents que l'on séquence, et par-là même du nombre de séquences différentes que l'on obtient. Une banque d'ADNc normalisée est en cours de séquençage chez le pin maritime en vue d'obtenir 10 000 EST de xylème (<http://www.pierroton.inra.fr/Gemini/>). Une banque d'ADNc non normalisée de xylème est en cours de séquençage chez le pin à encens



**Figure 12** : Banques soustractives. **1)** Synthèse des ADN c à partir des ARN m pour les deux conditions à analyser. **2)** Chacun des deux lots de fragments est divisé en 2, une partie étant marquée pour être utilisée comme sonde, l'autre clonée dans un vecteur et insérée dans des bactéries. **3)** La sonde de la condition 1 est utilisée pour hybrider les membranes correspondant aux empreintes des colonies de la condition 2, et *vice versa*. **4)** Les membranes sont ensuite mises à révéler. Seules les colonies spécifiques de chacune des conditions seront ultérieurement analysées.

(<http://www.cbc.med.umn.edu/ResearchProjects/Pine/DOE.pine/index.html>) et vise 100 000 EST.

L'avantage principal du séquençage d'EST est l'accès direct à la partie codante du génome pour un coût raisonnable (12FF par EST sans la main d'œuvre). De plus, les informations obtenues présentent un intérêt non négligeable dans le cadre de l'annotation des génomes et représentent un formidable outil pour le clonage positionnel ou la génétique inverse (Gerhold et Caskey, 1996). À l'inverse des séquences obtenues dans le cadre d'un séquençage systématique, la fiabilité des séquences n'est que de 97%, car le séquençage s'effectue le plus souvent en une seule fois et dans un seul sens (Marra et al., 1998).

Malgré les traitements informatiques des séquences, leur accumulation sur les bases de données, il reste de gros efforts à fournir tant au niveau moléculaire et biochimique qu'au niveau physiologique pour accéder à leur fonction. C'est pourquoi, des approches ont été développées pour analyser l'expression d'un grand nombre de gènes.

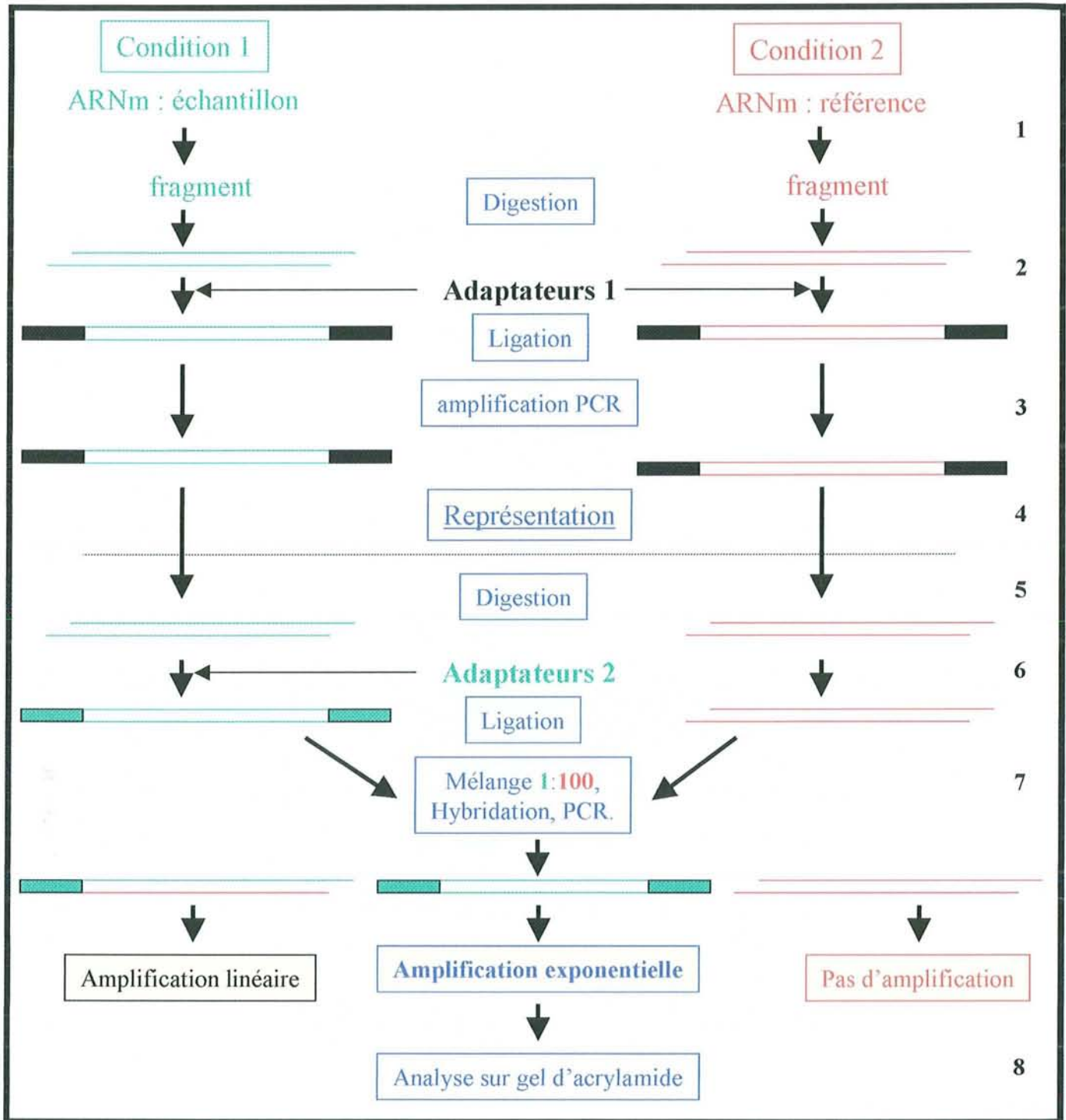
## **2. La génomique fonctionnelle**

La biologie moléculaire propose des outils extrêmement puissants pour étudier l'expression des gènes et des protéines. La génomique fonctionnelle, qui s'intéresse à l'ensemble des transcrits (transcriptome) et des protéines (protéome) propose des stratégies très performantes pour permettre une analyse pratiquement exhaustive de l'expression de l'ensemble des gènes et des protéines.

Il s'agit, dans la pratique, de comparer l'expression des gènes/protéines au sein d'un même organisme, dans des états physiologiques contrastés. Les informations obtenues permettent de déterminer l'ordre et les conditions d'expression des gènes mais aussi de prédire la fonction.

### **2.1. Les différentes techniques d'étude du transcriptome**

Une des premières techniques permettant d'analyser en masse les populations d'ARNm repose sur la construction de banques d'ADNc, et nécessite de grandes quantités d'ARNm (de l'ordre de 0,5 à 10µg d'ARNm, Schraml et al., 1993 - Rivolta and Wilcox., 1995 - Ghosh, 1996). Cette technique dite des « banques soustractives » repose sur l'hybridation



**Figure 13 :** L' ADNC- RDA, d'après Hubank et Schatz (1994). **1):** Synthèse des fragments pour l'échantillon et la référence. **2):** Après digestion des fragments, des adaptateurs-1 sont ligués à leurs extrémités. **3):** Amplification PCR à partir d'amorces localisées sur les adaptateurs. **4):** Cette PCR ayant pour but d'augmenter le signal des transcrits (représentation). **5):** Les adaptateurs-1 sont ensuite éliminés par digestion. **6):** Seul l'échantillon va être ligué avec un nouvel adaptateur-2. **7):** Après dénaturation des 2 lots de fragments de restriction, une étape d'hybridation a lieu afin d'éliminer les redondances entre les 2 conditions. **8):** Amplification PCR avec les amorces correspondant à l'adaptateur-2. Cette PCR permettant d'amplifier seulement les fragments différemment exprimés entre les 2 conditions. Une expérience symétrique est nécessaire pour analyser les transcrits spécifiques de la référence.

différentielle entre deux populations d'ARNm (figure 12). Les problèmes majeurs de cette technique sont liés à la construction et à l'analyse des banques, ainsi qu'à la récupération des clones différentiels. Cette technique reste donc très lourde à mettre en œuvre. Le développement de la PCR (Saiki et al., 1987) a permis de mettre au point des méthodes plus efficaces en terme de rapidité, de souplesse et de sensibilité. Les nouvelles méthodes d'analyse d'expression, regroupées sous le terme de « mRNA-fingerprinting », permettent la détection de transcrits en combinant la synthèse d'ADNc et la PCR.

On trouvera donc des techniques d'analyse faisant intervenir à la fois l'hybridation de fragments d'ADNc et la PCR, celles basées uniquement sur la PCR et enfin, celles reposant sur l'hybridation ou le séquençage de très courtes séquences nucléotidiques qui permettent d'étudier en masse l'expression de fragments d'ADNc déjà connus.

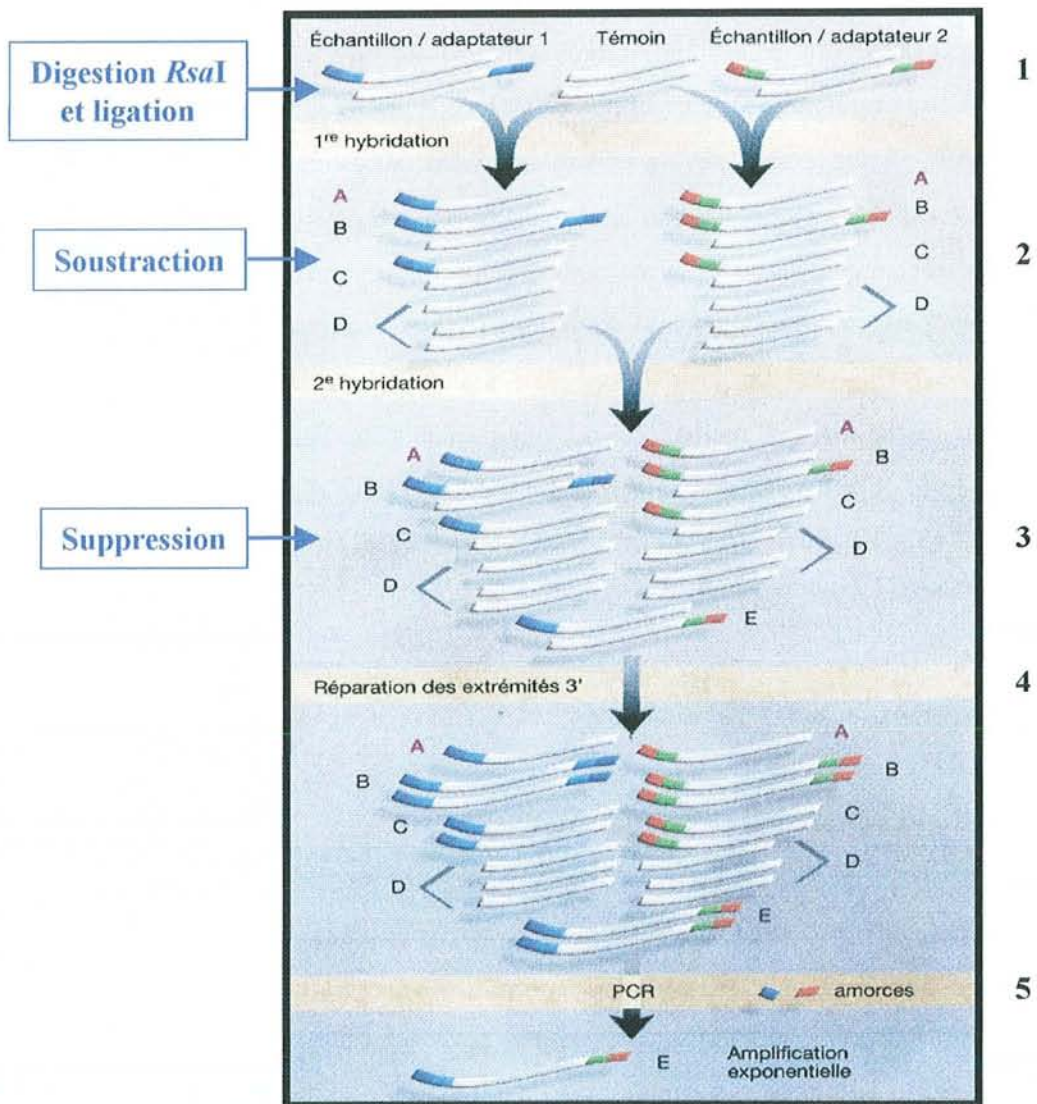
### **2.1.1. Technique combinant PCR et hybridations**

#### **2.1.1.1. ADNc-RDA (Representational Difference Analysis)**

L'ADNc-RDA est un procédé basé sur l'hybridation soustractive couplée à une amplification PCR. Cette technique a initialement été développée pour des analyses d'ADN génomique (Lisitsyn et al., 1995) afin d'identifier les différences entre deux génomes complexes. Gyax et al. (1997) ont par exemple utilisé cette méthode pour identifier des marqueurs moléculaires liés à la résistance à un pathogène chez le pommier (*Malus domestica*).

Cette méthode permet d'éliminer les fragments communs présents dans les deux populations d'ADNc pour ne mettre en évidence que les différences (figure 13). Si un fragment de restriction amplifié est présent dans un ensemble cible d'ARNm (échantillon), et s'il est absent dans la population témoin (référence), un enrichissement en fragment cible est possible par le biais d'hybridation soustractive de l'échantillon en présence d'un excès de référence (ratio de 1 pour 100, respectivement). Les séquences homologues avec l'échantillon sont rendues non amplifiables, et seuls les fragments différentiels sont théoriquement amplifiés lors de la PCR. Des phases successives de soustraction/amplification PCR permettent alors de produire une population enrichie en fragments différentiels.





**Figure 14** : La SSH, d'après Feuerstein et Wang (1999). Utilisée pour isoler, de manière spécifique, les fragments d'un échantillon comparé à une référence (témoins). **1**) : Synthèse des ADNc, et digestion enzymatique. Les fragments de restriction de l'échantillon sont ensuite séparés en 2 lots et ligués à 2 types d'adaptateurs différents (bleu clair/bleu foncé et vert/rouge). **2**) : Première hybridation afin de soustraire les fragments communs entre l'échantillon et le témoin. Pour chacun des 2 lots, on obtient 5 types de fragments : A) : fragment échantillon simple brin avec adaptateur, B) : fragment échantillon double brin avec adaptateur, C) : fragment échantillon avec adaptateur hybridé avec fragment témoin, D) : fragment témoin simple et double brin. **3**) : Deuxième hybridation pour éliminer les fragments redondants au sein de l'échantillon (suppression). **4**) : Synthèse des bords francs. **5**) : Amplification PCR à partir d'amorces localisées sur les adaptateurs (bleu foncé/rouge), où seuls les fragments différentiels et non redondants dans l'échantillon seront réamplifiés. A) : amplification linéaire (fragments échantillons simple brin et 1 seul adaptateur à 1 seule extrémité), B) : amplification linéaire (fragments échantillons double brin et 1 seul adaptateur aux 2 extrémités), C) : amplification linéaire (fragments échantillons double brin et 1 seul adaptateur à 1 seule extrémité), D) : pas d'amplification (fragments témoins sans adaptateur), E) : amplification exponentielle des fragments échantillons double brin avec les 2 adaptateurs différents. Une expérience symétrique est nécessaire pour analyser les transcrits spécifiques de la référence.

Cette technique a été utilisée avec succès sur des microorganismes (Fujii, et al., 1999), des animaux (Mitrovich et Anderson., 2000) ou des plantes, notamment chez *Pisum sativum* pour déterminer quels gènes étaient régulés sous l'action de la photopériode (Li et al., 1998 – Zhu et al., 1998). Cependant, malgré la qualité des résultats obtenus, la mise en œuvre de cette technique reste assez lourde.

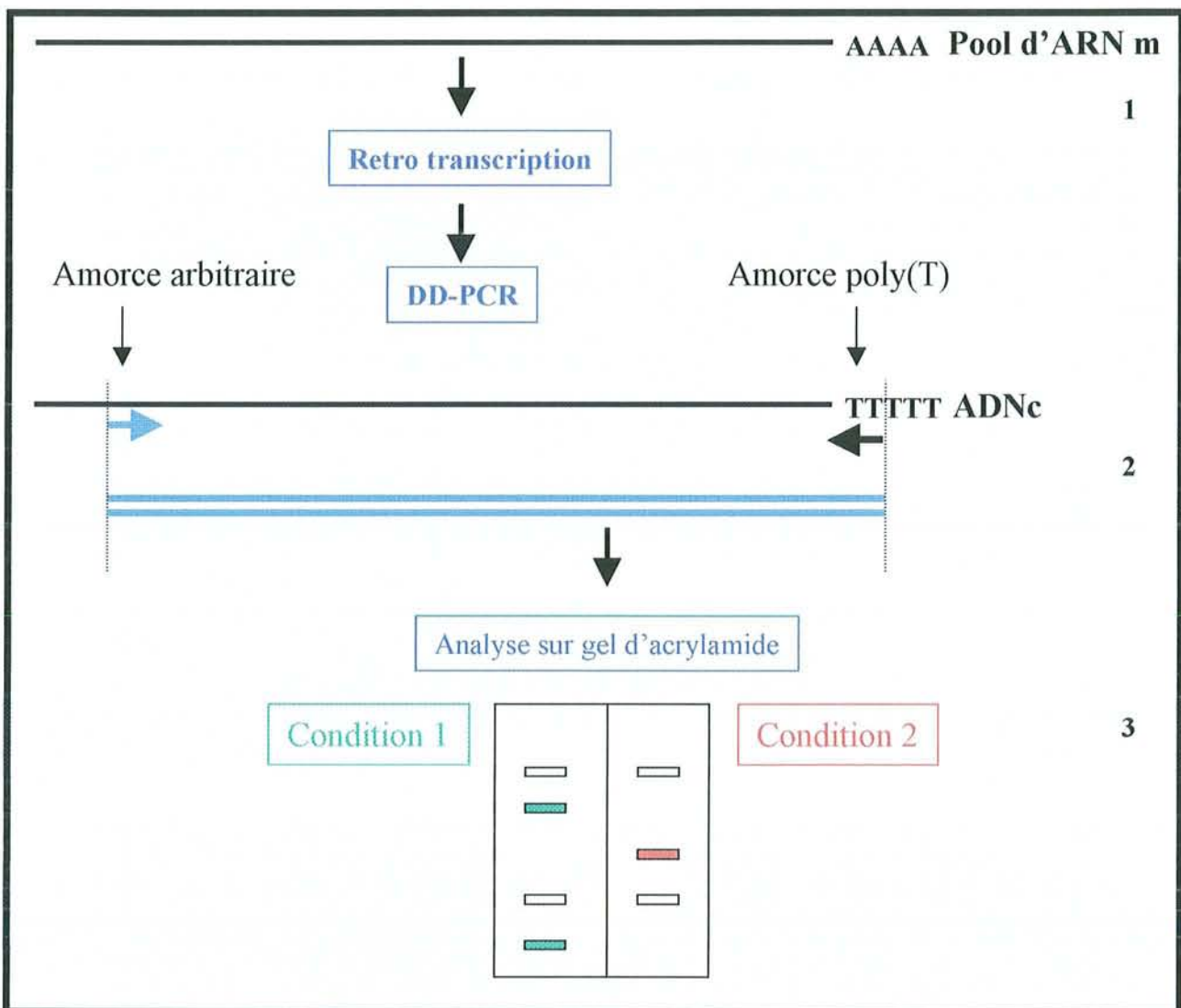
#### 2.1.1.2. SSH (Suppression Subtractive Hybridization)

Cette technique permet l'amplification sélective par PCR de fragments d'ADNc dont l'expression est spécifique d'un état physiologique particulier tout en évitant d'amplifier les fragments communs. Comme dans le cas de l'ADNc-RDA, on va utiliser deux groupes d'ADNc correspondant à chacune des conditions, dont l'un sera utilisé comme échantillon et l'autre comme référence. Cette technique mise au point par Diatchenko et al., (1996) a été principalement utilisée dans le domaine médicale (Harris et al., 1998 – Birch et al., 2000). Dans la pratique (figure 14), après synthèse des ADNc échantillon et référence (témoin), une digestion est réalisée à l'aide d'une enzyme de restriction (*RsaI*) afin d'obtenir des fragments plus courts et à bords francs. Puis les ADNc échantillons sont séparés en deux lots, liés chacun à une courte séquence spécifique (adaptateur) qui va permettre de différencier chacun des deux lots.

Par la suite, deux hybridations successives sont réalisées :

la première, consiste à mettre les ADNc échantillon dénaturés en présence d'un excès d'ADNc référence lui aussi dénaturé, chaque lot d'ADNc échantillons étant traité séparément. Après hybridation des séquences communes, on obtient un ensemble de fragments qui ont la même concentration et qui correspondent aux transcrits exprimés de manière différentielle.

Lors de la seconde hybridation, les deux produits de la première hybridation sont mélangés en l'état. Les fragments d'ADNc, simples brins obtenus lors de la première hybridation, s'apparient entre eux, et sont amplifiés par PCR en utilisant des amorces spécifiques des deux adaptateurs correspondant aux deux lots d'ADNc échantillons.



**Figure 15 :** La DDRT-PCR. **1)** Synthèse des fragments. **2)** Amplification PCR à partir d'une amorce localisée au niveau de la queue poly(T) des fragments (en 3'-terminal), et d'une autre amorce choisie de manière arbitraire. **3)** Séparation des produits PCR généralement sur gel d'acrylamide. Seuls les fragments différentiels entre les deux conditions seront analysés ultérieurement.

Chez les plantes, cette technique a été utilisée avec succès dans des études de développement, avec l'identification de gènes impliqués dans la maturation florale chez *Dianthus caryophyllus* (Kim et al., 1999), pour des études sur la résistance à des pathogènes tels que *Phytophthora infestans* chez la pomme de terre (*Solanum tuberosum*, Birch et al., 1999), ou bien encore pour la détermination des gènes impliqués dans l'association symbiotique entre *Eucalyptus globulus* et *Pisolithus tinctorius* (Voiblet et al., 2001). La SSH a aussi permis l'isolation de cinq transcrits répondant à un stress à l'ozone chez *Pisum sativum* (Savenstrand et al., 2000). Bien que cette technique récente soit assez coûteuse et délicate à mettre en œuvre, elle semble être un outil d'analyse extrêmement puissant.

### **2.1.2. Techniques basées sur la PCR**

Les techniques uniquement basées sur la PCR offrent l'avantage d'être extrêmement faciles à mettre en œuvre. En combinant plusieurs amorces PCR, il est possible d'analyser une grande population de transcrits et de distinguer ceux dont l'expression varie de ceux où elle reste constante, par simple comparaison des profils d'expression. Contrairement à l'ADNc-RDA et à la SSH où seules deux conditions pouvaient être comparées à la fois, il est ici possible d'analyser différents échantillons, correspondant par exemple à différents stades de développement ou différents niveaux de stress, en une seule expérience.

#### **2.1.2.1. DDRT-PCR (Differential display)**

Cette technique a été mise au point par Liang et Pardee (1992). C'est l'approche la plus facile à mettre en œuvre car les amorces utilisées correspondent pour la première à une séquence poly(T), et pour la seconde à une courte séquence nucléotidique (10nt) choisie de manière aléatoire. Les réactions PCR sont réalisées à faible température et leurs produits séparés sur gel d'acrylamide (figure 15).

Initialement, la réaction PCR était effectuée avec des nucléotides marqués ( $\alpha$ -[<sup>32</sup>P]dATP,  $\alpha$ -[<sup>33</sup>P]dATP ou  $\alpha$ -[<sup>35</sup>S]dATP) et les fragments PCR obtenus étaient séparés sur gel d'acrylamide et révélés par autoradiographie (Song et al., 1995). Cependant, il est maintenant possible de séparer les produits PCR sur gel d'agarose et de les visualiser par coloration au bromure d'éthidium (Pienta et Schwab, 2000).

Comme l'amplification des fragments repose sur une amorce poly(T), les séquences obtenues correspondent aux extrémités 3'-terminales des gènes. Par conséquent, du fait de la présence

d'une zone non codante en 3'-terminale (3'-UTR : Untranslated Region), il est fréquent de ne pas pouvoir attribuer, par simple recherche sur les bases de données, de fonction aux transcrits isolés.

Il faut cependant souligner que cette technique a fait l'objet de beaucoup d'améliorations pour être réellement efficace. En effet, comme les amorces doivent pouvoir s'hybrider sur tout le mélange d'ADNc, la température d'hybridation de la PCR doit être faible. Ceci implique que la quantité de chaque amplifia n'est pas seulement fonction de la concentration initiale du messager, mais est aussi liée aux conditions d'hybridation entre l'échantillon et l'amorce localisée en 5' (McClelland et al., 1995). Il est donc fréquent d'obtenir des fragments d'ADNc qui sont des faux positifs (Zegzouti et al., 1997). De plus, il existe un biais lié au taux d'expression des messagers. En effet, les transcrits les plus rares sont plus difficilement amplifiés, au profit des messagers les plus abondants (Bertioli et al., 1995).

Malgré ces limitations, de nombreuses publications relatent l'identification et la validation de gènes différentiellement exprimés chez les plantes. On peut par exemple citer les gènes impliqués dans la synthèse des flavonoïdes (Saito et al, 1999), ou dans le développement floral (Yung et al., 1999 - Yu and Goh, 2000).

D'autres études se sont focalisées sur l'expression de gènes en réponse à divers stress, notamment le stress hydrique. On pourra citer Deleu et al. (1999) qui ont mis en évidence chez *Brassica napus* trois gènes régulés par un stress hydrique et correspondant à une sacchaporine déshydrogénase et une histone H3-1 (sur-expression), ainsi qu'une protéine ribosomale chloroplastique (sous-expression). De même, Muramoto et al. (1999), ont montré chez *Hordeum vulgare*, la sur-expression d'une nucléase. Enfin, Li et Chen (1999) ont isolé chez le riz une S-adénosylméthionine décarboxylase qui est sur-exprimé en condition de stress.

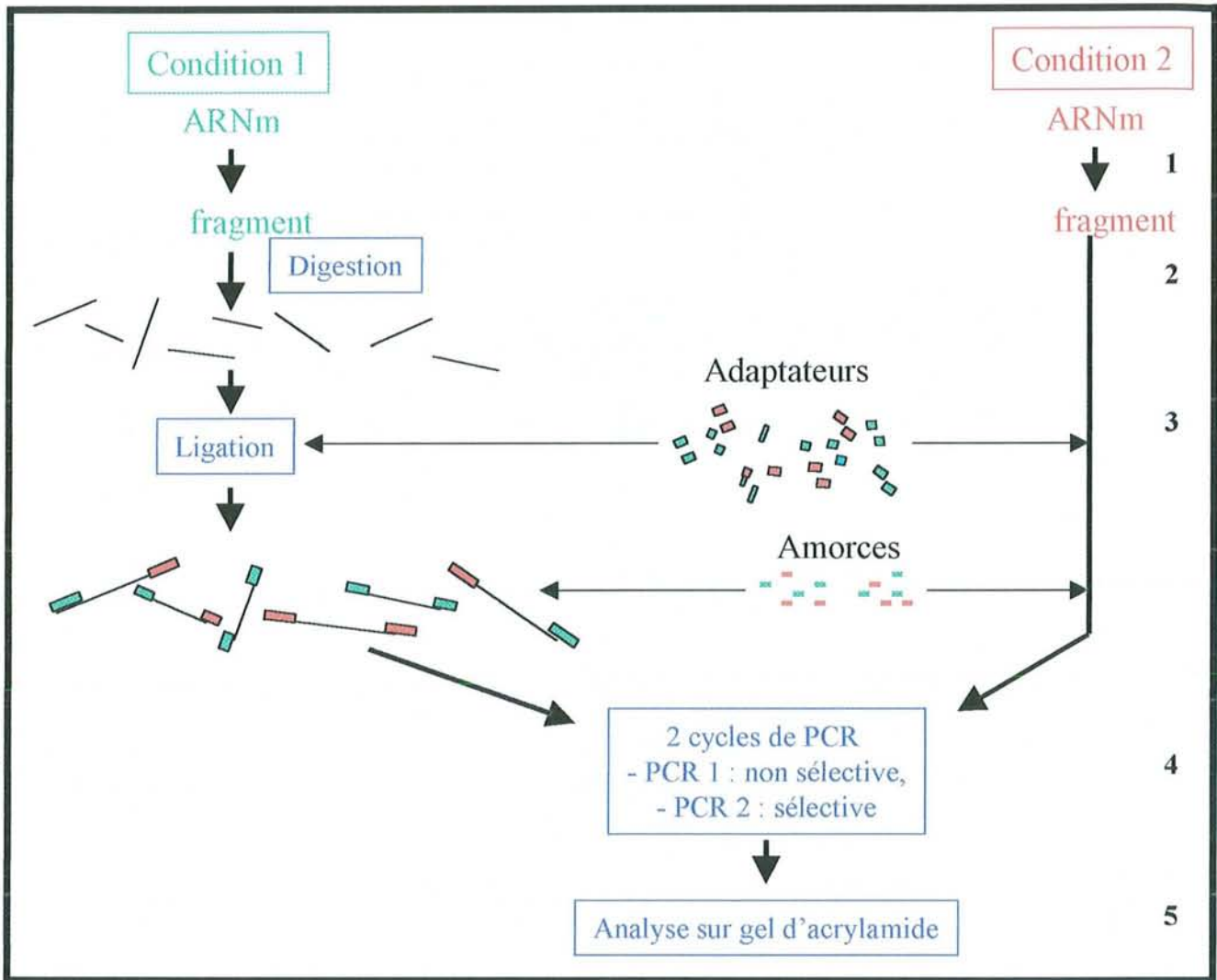
Enfin, chez les arbres forestiers, plus particulièrement chez le pin à encens, cette technique a permis non seulement de mettre en évidence des gènes discriminant les embryons zygotiques des embryons somatiques, mais aussi de suivre leur expression au cours du développement embryonnaire (Cairney et al., 1997 - Cairney et al., 1999).

### 2.1.2.2. AP-PCR (Arbitrarily Primed PCR)

Cette technique, qui s'apparente à la technique de RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA), a tout d'abord été développée pour le marquage moléculaire (Welsh et McClelland, 1990) de différents types d'organismes allant des procaryotes jusqu'aux eucaryotes supérieurs (Navarro JM et Jocardo JL, 1999 - Forster et al., 2000). Cette technique a également été adaptée pour l'analyse des profils d'expression.

Au niveau pratique, il s'agit d'amplifier par PCR un mélange d'ADNc avec des amorces choisies de manière arbitraire, en augmentant la température d'hybridation au fur et à mesure que les cycles de la PCR s'enchaînent. Lors du premier cycle de la PCR, qui s'effectue à faible température d'hybridation, les amorces vont amplifier des fragments non spécifiques. Après quelques cycles d'amplification, une partie des fragments va être amplifiée de manière spécifique, c'est-à-dire qu'il présenteront à leurs extrémités la séquence exacte des amorces utilisées pour la PCR. Enfin, lorsque la température continue d'augmenter, seuls les fragments spécifiques sont amplifiés de manière exponentielle. Les bandes ainsi amplifiées permettent d'obtenir un profil particulier pour chaque échantillon testé. Les fragments amplifiés sont ensuite séparés sur gel d'acrylamide. Des modifications ont été apportées à cette méthode tel qu'un couplage avec la DDRT-PCR à l'AP-PCR, en utilisant une amorce poly(T) et une amorce arbitraire (Rothschild et al., 1997). Une autre méthode dérivée (TRAP-PCR : Target RNA AP-PCR), a consisté à utiliser des amorces spécifiques d'une famille particulière de gènes afin d'évaluer les modifications d'expression entre différentes conditions (Vinyals et al., 1998).

Bien que cette technique ait montré son efficacité pour les études d'expression, son utilisation reste limitée au règne animal (Wang et al., 1996 - Rothschild et al., 1997 - Vinyals et al., 1998).



**Figure 16 :** L'ADNc-AFLP. 1): Synthèse des fragments. 2): Digestion des fragments de chacune des conditions avec 1 ou 2 enzymes de restriction. 3): Ligation aux extrémités des fragments de restriction d'adaptateur spécifique du site de restriction. 4): Amplification PCR. La première étant non sélective afin d'amplifier le « pool » de fragments (amorces complémentaires des adaptateurs). La seconde servant à amplifier des sous populations de fragments (même amorces que pour la première PCR, mais avec des bases sélectives en plus : de 1 à 3. 5): Les produits issus de la seconde amplification PCR sont alors séparés sur gel d'acrylamide. Seuls les fragments différentiels seront analysés ultérieurement.

### 2.1.2.3. ADNc-AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)

L'ADNc-AFLP est basée sur la technique de marquage moléculaire (AFLP) développée par Vos et al. (1995).

L'application de l'AFLP à l'étude du transcriptome (figure 16) repose sur une amplification sélective d'une sous population de transcrits, et a été mise au point par Bachem et al. (1996). Au niveau des enzymes de restriction, Pst I/Mse I et Ase I/Taq I ont été utilisés avec succès chez les plantes, mais en théorie toute paire d'enzymes combinant une enzyme à 4pb et une à 6pb peut donner des résultats satisfaisants (Money et al., 1996; Habu et al., 1997). Les conditions PCR utilisées sont très stringentes, facilitées par l'addition d'adaptateurs double brin aux extrémités des ADNc digérés, qui servent de site d'hybridation pour les amorces.

Dans un premier temps, une PCR non sélective est effectuée afin d'amplifier l'ensemble des fragments de restriction. La sélection des fragments est donnée par l'addition d'une base ou plus sur les amorces de la seconde PCR, qui ne fonctionne que s'il y a complémentarité entre les bases ajoutées et les bases du fragment de restriction qui jouxtent l'adaptateur. Ceci permet de réduire le nombre de bandes amplifiées et ainsi d'augmenter la séparation et la résolution entre les fragments.

Cette méthode semble plus efficace que la DDRT-PCR, en terme de discrimination (moins de faux positifs). La combinaison de la coloration au nitrate d'argent à l'ADNc-AFLP accentue ces avantages, notamment pour les étapes ultérieures de clonage et de caractérisation des clones (Dubos et Plomion, 2001a).

Bien que cette technique présente de nombreux avantages en terme de sensibilité, de rapidité et de fiabilité, on constate à travers les publications qu'elle a surtout été utilisée pour des espèces végétales (tableau 2). L'ADNc-AFLP a montré son efficacité dans des études développementales comme par exemple chez la pomme de terre (*S. tuberosum*) avec la détermination des gènes impliqués dans la tubérisation (Bachem et al., 2000), ou bien chez la chicorée (*Cichorium intybus*) pour identifier les transcrits impliqués dans l'induction de la formation des tiges, lors de cultures *in vitro* de racines (Demeulemeester et de Proft, 2000).



**Tableau 2** : Liste des organismes pour lesquels la technique d'ADNc-AFLP à été utilisée.

Espèce	Thématique	Auteurs	Règne*
<i>Solanum tuberosum</i>	Développement des tubercules	Bachem et al., 1996	V
<i>Triticum aestivum</i>	Comparaison de génotypes	Money et al., 1996	V
<i>Ipomoea purpurea</i>	Développement floral	Habu et al., 1997	V
<i>Solanum tuberosum</i>	Développement des tubercules	Bachem et al., 1998	V
<i>Globodera rostochiensis</i> et <i>G. pallida</i> / <i>Solanum tuberosum</i>	Interaction plante/pathogène	Jones et al., 1998	A / V
<i>Ratus norvegicus</i>	Activités métastatiques	Fukuda et al., 1999	A
<i>Erwinia carotovora atroseptica</i> et <i>E. carotovora carotovora</i>	Comparaison de 2 sous espèces	Dellagi et al., 2000	P
<i>Cichorium intybus</i>	Développement des tiges	Demeulemeester et Profijt, 2000	V
<i>Cladosporium fulvum</i> / <i>Lycopersicum esculentum</i>	Interaction plante/pathogène	Durrant et al., 2000	C / V
<i>Lupinus angustifolius</i>	Biosynthèse des alcaloïdes	Hirai et al., 2000	V
<i>Rubus idaeus</i>	Maturation des fruits	Jones et al., 2000	V
<i>Globodera rostochiensis</i>	Spécificité tissulaire	Ling et al., 2000	A
<i>Manihot esculenta</i>	Cartographie	Suarez et al., 2000	V
<i>Penorospora parasitica</i> / <i>Arabidopsis thaliana</i>	Interaction plante/pathogène	Van Der Biezen et al, 2000	C / V
<i>Pinus pinaster</i>	Stress hydrique	Dubos et Plomion, 2001	V
<i>Globodera rostochiensis</i>	Interaction plante/pathogène	Qin et al., 2001	A

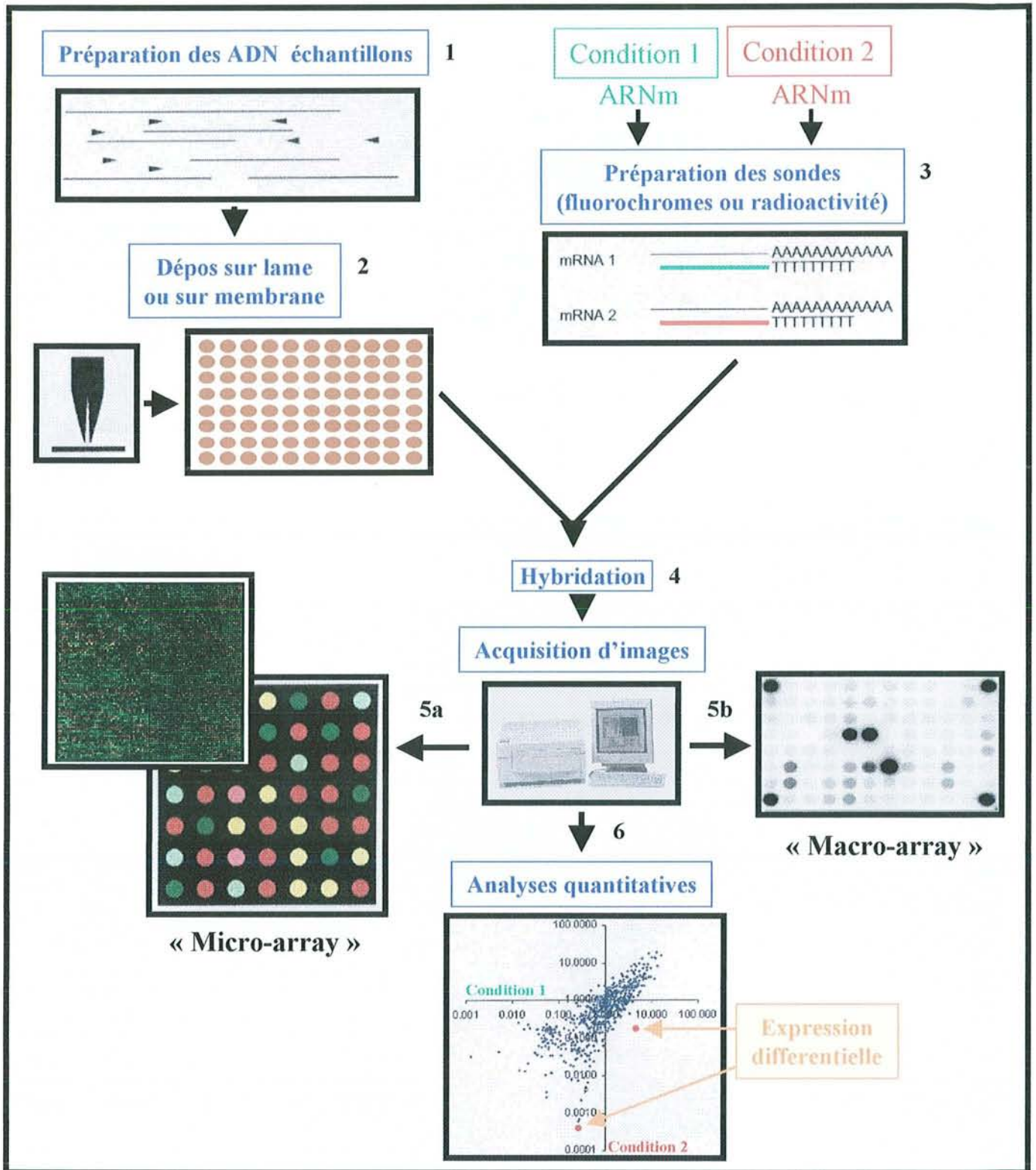
\* : A): animal ; V): végétal ; C): champignon ; P): procaryotes.

Bien que cette méthode ait été mise au point pour des études développementales, on constate que son utilisation majeure, en terme de publication, est plutôt reliée aux interactions entre plantes et microorganismes (van der Biezen et al., 2000 – Qin et al., 2000 – Qin et al., 2001).

On peut se rendre compte de la puissance d'analyse de cette technique en regardant plus en détail les travaux de Durrant et al., (2000) concernant l'interaction incompatible entre une culture cellulaire de tabac présentant le gène de défense Cf-9 (*Nicotiana tabacum*) et *Cladosporium fulvum* qui possède le gène d'avirulence Avr-9. Ces auteurs ont analysé les gènes dont l'expression est rapidement altérée lors de cette interaction incompatible, indépendamment de la formation d'espèces activées de l'oxygène. Ils ont isolé 263 transcrits différentiels parmi lesquels 13 présentaient une expression différentielle pour d'autres types de stress. Parmi les fragments isolés, certains présentaient des homologies avec des facteurs de transcription. Au travers de ces résultats, on peut donc se rendre compte de l'efficacité de cette méthode en terme de nombre de fragments isolés potentiellement différentiels, mais aussi en terme de sensibilité (identification de facteurs de transcription). Enfin, on pourra citer son application dans le règne animal, notamment au niveau de l'étude des gènes impliqués dans la formation de cellules métastatiques de rat (Fukuda et al., 1999).

### 2.1.2.4. Autres techniques

Nous venons ici de présenter les techniques basées sur la PCR les plus couramment utilisées. Cependant, cette liste n'est pas exhaustive. Ainsi, d'autres méthodes ont été décrites bien que moins fréquemment utilisées. On pourra citer par exemple la méthode de Ivanova et Belyavsky (1995) basée sur les profils de restriction des ADNc dans leur partie 3'-terminale. Dans ce cas, les auteurs isolent les extrémités 3', après digestion par des endonucléases, puis effectuent une amplification PCR, et digèrent à nouveau les ADNc par d'autres enzymes de restriction. Ils obtiennent ainsi des profils localisés dans la région 3'-terminale des ADNc. Prashar and Weissman (1996) ont aussi développé une technique basée sur l'analyse différentielle de fragments d'ADNc localisés en 3'-terminale. Dans ce cas, les fragments digérés sont ligués à des adaptateurs, et la PCR qui suit est réalisée à partir d'amorces localisées sur les adaptateurs et au niveau du poly(T). Ivashuta et al., (1999) ont quant à eux développé une méthode couplant la DDRT-PCR et l'ADNc-AFLP.



**Figure 17 : ADN en réseaux.** 1): Les ADN que l'on désire déposer sur lames de verre ou sur membranes sont amplifiés et mis à une concentration déterminée. 2): Les ADN ainsi préparés sont alors déposés sur leur support à des positions spécifiques. 3): A partir des ARNm des conditions que l'on désire comparer on synthétise des ADNc qui servent de sondes. 4): Les sondes sont ensuite mises en contact avec les ADN préalablement déposés (hybridation). 5a): Analyses d'images pour les « micro-arrays », où les sondes ont été marquées à l'aide de fluorochromes. 5b): Analyses d'images pour les « macro-arrays », où les sondes ont été marquées radioactivement. 6): Analyse quantitative des différents ADN, entre les 2 conditions. L'intensité observée est directement proportionnelle à la quantité de transcrits présents dans chacune des conditions.

### 2.1.3. Techniques basées sur l'acquisition en masse de séquences codantes

#### 2.1.3.1. Réseaux d'ADN (« Arrays » ou « Chips »)

Récemment, une nouvelle technologie a été mise au point pour étudier en masse les profils d'expression des gènes: les « DNA chips » ou puces à ADN (Schena et al., 1996). Cette technique, aussi appelée « DNA array » (réseau d'ADN) est basée sur la capacité de liaison entre une sonde et un fragment d'ADN, ou un oligonucléotide préalablement caractérisé. Il existe deux grandes méthodes, basées sur le support utilisé et sur le nombre de fragments d'ADN (ou de nucléotides) que l'on peut analyser.

La première appelée « macro-arrays » (ou filtres à ADNc) est basée sur l'utilisation de membranes de nylon, sur lesquelles est déposé un faible nombre (de la centaine jusqu'au millier) d'échantillons différents. Les sondes utilisées sont généralement marquées de manière radioactive (Voiblet et al., 2001).

Dans la seconde méthode (« micro-array »), les échantillons sont disposés sur une lame de verre (figure 17). Chaque lame de verre est construite sur la base d'une indexation de chacun des fragments par le biais d'automates. L'ADN que l'on dépose peut avoir été choisi à partir de n'importe quelle base de données qui regroupe des ADNc, des EST, des clones d'ADN génomique ou bien encore des phases ouvertes de lecture (ORF : Open Reading Frame). Il est aussi possible d'utiliser les ADNc provenant des technologies présentées dans les paragraphes précédents, telles que l'ont montré Yang et al. (1999) en utilisant des clones issus de la SSH. En théorie, tous les 25 000 gènes d'*Arabidopsis thaliana* peuvent être déposés sur une seule lame (Kehoe et al., 1999). Les technologies développées permettent aussi de disposer 409 000 amorces oligonucléotidiques sur une surface de 1,28 cm<sup>2</sup> (Fodor, 1997).

Cette technique est très sensible, et permet de détecter des ADNc qui ont un niveau d'expression de l'ordre de 1 copie pour 100 000 à 500 000 molécules d'ARNm (Gerhold et al., 1999). Les sondes utilisées correspondent à l'ensemble des ARNm spécifiques de l'état physiologique que l'on désire analyser (développement, stress, etc.). Elles peuvent aussi correspondre à des fractions d'ADNc, issues de l'utilisation de techniques différentielles comme l'ont montré Geng et al. (1998) à partir de l'ADNc-RDA. Ainsi, il est possible de

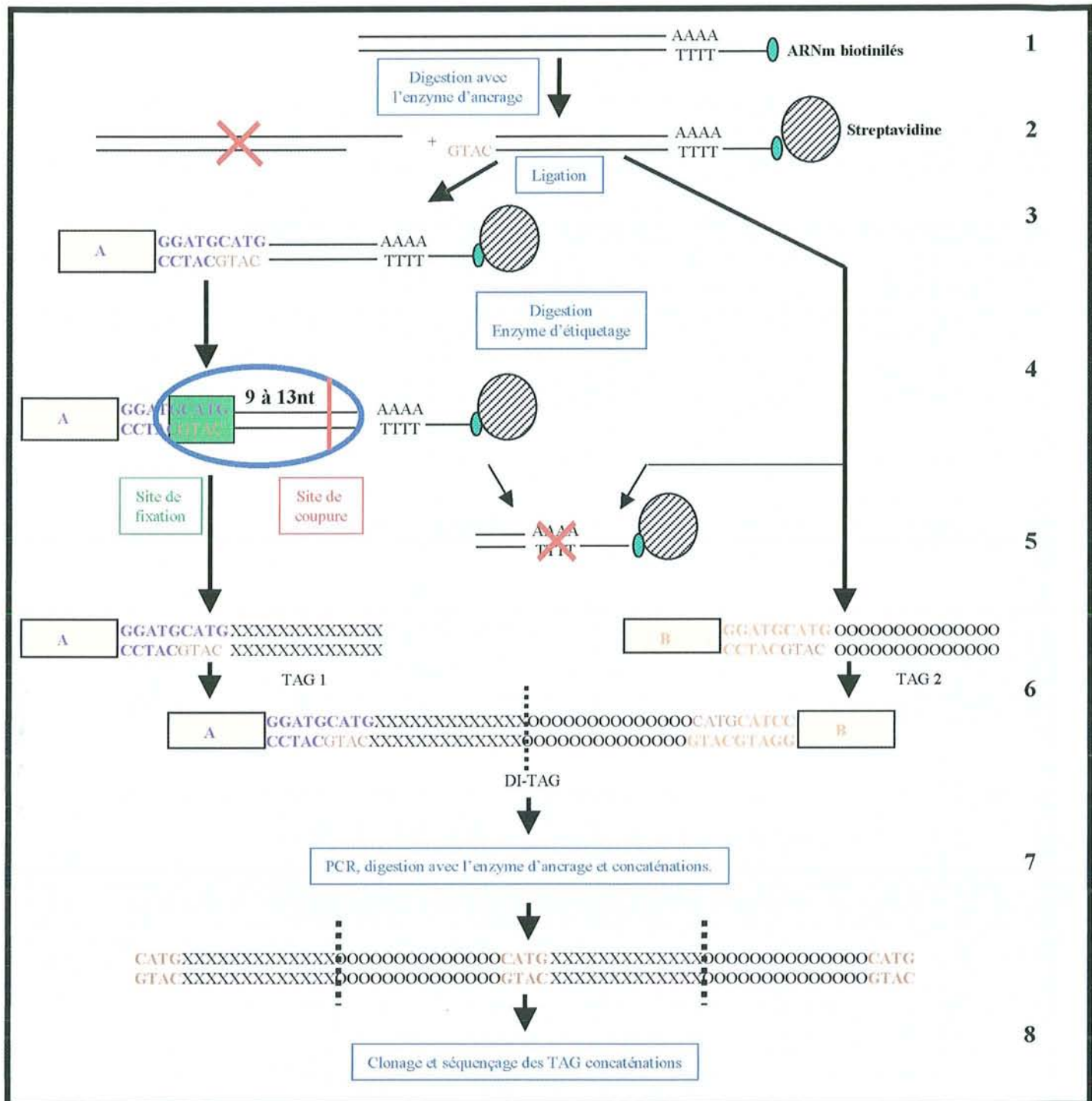
caractériser un transcrit grâce aux variations d'expression que l'on peut observer après différentes hybridations.

Une élégante démonstration de l'efficacité de cette technique a été apportée par DeRisi et al. (1997). En utilisant des microarrays, contenant tous les transcrits de *Saccharomyces cerevisiae*, ces auteurs ont mis en évidence les changements de niveau d'expression des transcrits au cours du passage de la fermentation vers la respiration. De nombreux gènes, dont la fonction était inconnue, ont montré une variation nette de leur expression. Bien que leur fonction exacte n'ait pas été élucidée, leur implication dans la reprogrammation du métabolisme de *S. cerevisiae* apparaît certaine. Cette expérience a donc pu permettre d'attribuer sinon une fonction, au moins une implication au niveau de la physiologie de la cellule. Chez les plantes, on pourra citer les travaux de Desprez et al. (1998) qui ont caractérisé 800 transcrits d'*A. thaliana* en fonction de leur sensibilité à la lumière, ou bien de Wang et al. (2000) qui ont utilisé des lames contenant 5524 gènes/clones d'*A. thaliana* afin de découvrir de nouveaux transcrits impliqués dans le métabolisme azoté ou dans sa régulation. Au niveau des arbres forestiers, on pourra citer les travaux de Voiblet et al. (2001) qui ont utilisé cette technologie pour analyser les variations d'expression des gènes au cours de l'association symbiotique entre *Eucalyptus globulus* et *Pisolithus tinctorius*. Les auteurs ont analysé 850 clones d'ADNc, dont 17% varient lors de cette association, mettant en avant les profonds changements qui se produisent au niveau de l'expression des gènes lors de ce phénomène.

Cependant, certains désavantages persistent malgré la grande précision de cette technique, à savoir son coût très élevé dû à l'utilisation unique de chaque lame ainsi préparée, et à la nécessité de logiciels informatiques appropriés pour la détection et l'analyse quantitative des signaux. Il faut ajouter à cela, la nécessité de standardiser la technique.

### 2.1.3.2. SAGE (Serial Analysis of Gene Expression)

La SAGE est une technique extrêmement puissante et rapide pour identifier et évaluer la fréquence de milliers de transcrits. Le principe de la SAGE repose sur la spécificité de courtes séquences nucléotidiques (de 9 à 13nt) localisées sur l'extrémité 3'-terminale de chaque transcrit. En effet, une séquence de neuf nucléotides est capable de discriminer 262 144 transcrits ( $4^9$ ), chiffre bien supérieur au nombre de gènes estimé dans une cellule. Ce



**Figure 18 :** Schéma récapitulatif de la SAGE. **1):** Synthèse des fragments à partir d'une amorce poly(T) biotinillée. **2):** Fixation des fragments sur de la streptavidine, puis digestion avec l'enzyme d'ancrage. **3):** Séparation des fragments digérés en 2 lots. Ligation d'un adaptateur différent pour chacun des 2 lots. **4):** Digestion avec l'enzyme d'étiquetage, qui coupe de 9 à 13 nucléotides après son site de fixation (sur l'adaptateur). **5):** Élimination de la partie correspondant à la biotine. **6):** Formation des DI-TAG. **7):** PCR à partir d'amorces situées sur les 2 adaptateurs différents, puis concaténations des différents DI-TAG. **8):** Clonage et séquençage des TAG concaténations. Enfin, on calculera la fréquence d'apparition de chacun des TAG..

nonamère contient donc suffisamment d'informations pour différencier sans ambiguïté un transcrit au sein d'un mélange d'ARNm (Velculescu et al., 1995).

En pratique (figure 18), les ADNc double brin sont synthétisés à partir d'amorces oligo(dT) biotinylées. Les ADNc ainsi synthétisés sont ensuite digérés à l'aide d'une endonucléase (enzyme d'ancrage) possédant un site de reconnaissance à 4pb (e.g. *NlaIII*), coupant tous les 256pb. La partie 3'-terminale des fragments de digestion est ensuite isolée sur des billes de streptavidine. Ces fragments sont alors séparés en deux lots, chacun étant lié à un adaptateur différent (A et B). Une nouvelle enzyme de restriction (*FokI* : enzyme d'étiquetage), dont le site de reconnaissance se trouve sur les adaptateurs, est ensuite utilisée pour digérer chacun des deux lots. Cette enzyme d'étiquetage a la particularité de couper 20 paires de bases après son site de fixation sur l'ADN.

Cette étape permet donc d'obtenir les neufs nucléotides spécifiques de chaque transcrit (TAG). Une nouvelle étape de ligation a alors lieu entre les deux lots de fragments de digestion. A l'issue de cette ligation on obtient des di-TAG, qui correspondent à la ligation d'un TAG avec l'adaptateur A et un TAG avec l'adaptateur B. Ces di-TAG sont ensuite amplifiés par PCR (les amorces étant sur les adaptateurs A et B), digérés avec l'enzyme d'ancrage (pour éliminer les adaptateurs A et B), et les fragments ainsi obtenus sont alors concaténés avant d'être clonés.

La concaténation de ces courtes séquences (TAG) permet une analyse rapide et efficace des transcrits. En effet, une centaine de TAG se retrouve dans un même vecteur de clonage qui peut être séquencé en une seule fois. La fréquence de chacune des TAG nous renseigne sur le niveau d'expression absolu du gène correspondant (« northern *in silico* »).

Cependant, cette technique ne peut être appliquée que pour certaines espèces modèles pour lesquelles on dispose de nombreuses séquences en 3' terminale. On peut citer par exemple la levure (Velculescu et al., 1997), la souris (Chrast et al., 2000 - El-Meanawy et al., 2000) ou l'homme (Velculescu et al., 1999 - Ishii et al., 2000) et chez les végétaux, l'arabette et le riz. La SAGE a été utilisée par Matsumura et al. (2000) pour mettre en évidence quels types de gènes étaient les plus fortement exprimés sur des plantules de riz, et comment s'opéraient les variations transcriptionnelles lors du passage des plants d'un milieu aérobie à un milieu anaérobie. Ces auteurs ont aussi montré que la SAGE permettait de retrouver des fragments

d'ADNc plus longs par une simple réaction PCR, en utilisant le TAG comme amorce. Ce type d'amplification PCR peut à la fois permettre de cloner le gène d'intérêt et ainsi déterminer sa fonction, dans le cas où le TAG n'était pas encore répertorié ou bien s'il correspondait à un gène de fonction inconnue.

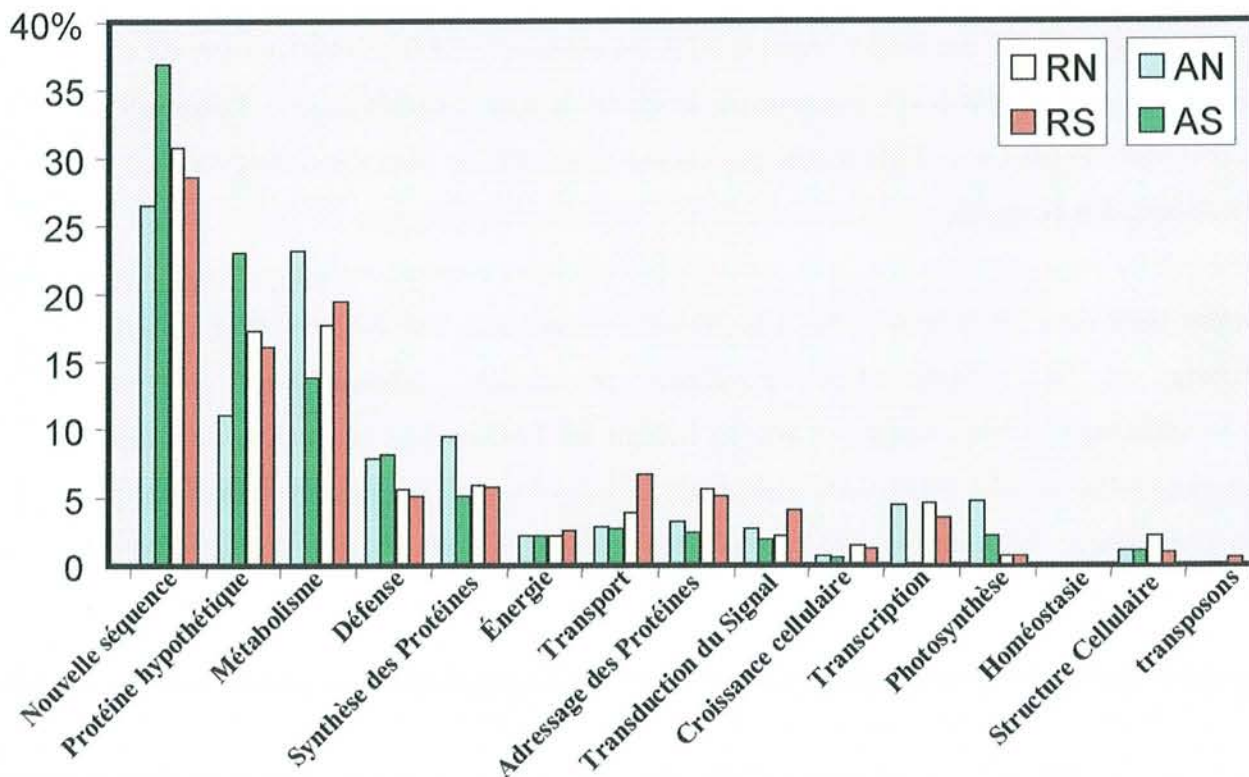
Certains biais dans les résultats, dus à la procédure technique, ont été cependant observés (Stolberg et al., 2000). Ces problèmes proviennent essentiellement d'erreurs d'échantillonnage, de séquençage, ou bien du fait que les TAG ne sont pas réalisés de manière totalement aléatoire. Ces auteurs ont aussi constaté que certains TAG ne correspondaient pas à un gène unique, notamment pour les espèces à grands génomes. Ce type de problème est rédhibitoire pour un organisme tel que le pin maritime où les familles multigéniques sont beaucoup plus importantes que chez d'autres espèces (Kinlaw et Neale, 1997).

### **2.1.3.3. Northern électronique (« Northern *in silico* » ou « Digital Northern »)**

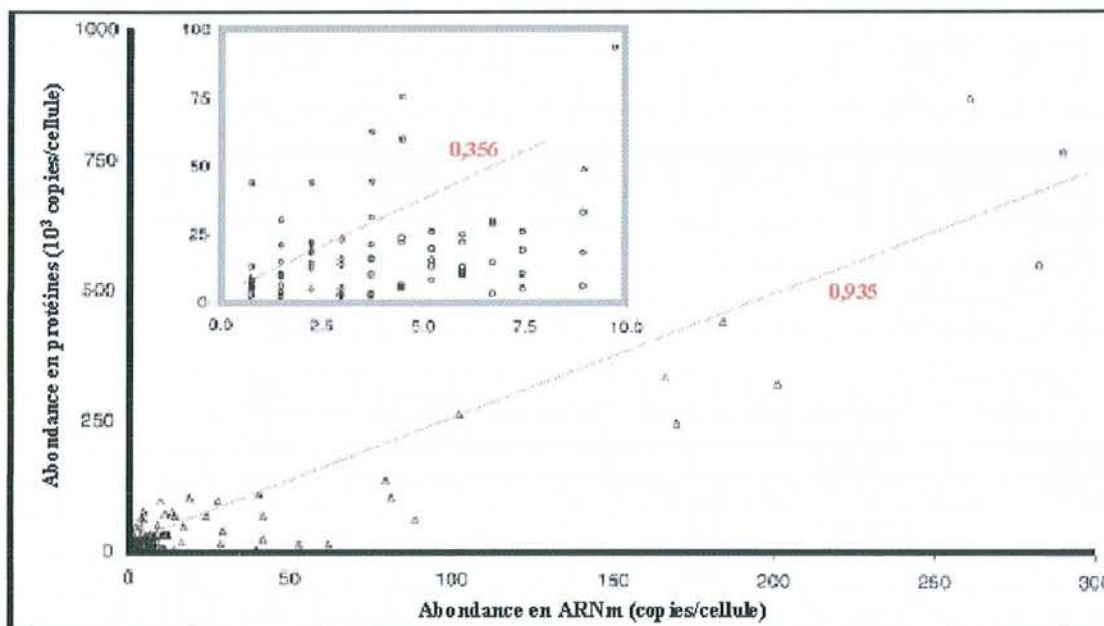
Cette technique s'appuie sur le séquençage à grande échelle de transcrits, dans leur région 3' ou 5'-terminale, à partir de banques d'ADNc non normalisées. Les banques d'ADNc utilisées provenant de différents types d'échantillons pour une même espèce (stress vs control, phases développementales, etc.). Lorsqu'on analyse les séquences obtenues, on observe qu'une bonne moitié des EST sont de fonction inconnue ou correspondent à des séquences totalement nouvelles. Or, si on veut analyser plus en détail certains de ces transcrits, il est nécessaire de savoir s'ils présentent un intérêt, c'est-à-dire une expression différentielle. Bien qu'il existe des méthodes classiques, au cas par cas (northern ou RT-PCR) ou en masse (réseau d'ADN), il est intéressant d'exploiter directement les résultats du séquençage pour réaliser ce type de vérification.

Suite au séquençage, la première étape consiste en une analyse bio-informatique des séquences obtenues, c'est-à-dire au regroupement des séquences homologues en « cluster » et à la recherche des fonctions probables correspondant à chacun de ces « clusters ». La deuxième étape consiste à calculer la fréquence d'apparition de chaque transcrit dans chacune des banques étudiées. On vérifie, par des tests statistiques, si les différences de fréquence observées entre les banques sont significatives (Audic et Claverie, 1997 – Claverie, 1999 – Ewing et al., 1999). Par rapport aux méthodes ciblées on obtient une quantité absolue de transcrits exprimés dans des conditions déterminées et non une quantité relative.





**Figure 19** : Classement des différentes EST séquencées provenant de chacune des quatre banques d'ADNc (A: aiguilles, R: racines, S: stressées, N: non-stressées) selon leur fonction cellulaire. (Classement selon Bohnert et al., <http://stress-genomics.org/>; séquences: J-M Frigerio, non publiées ).



**Figure 20** : Corrélation entre les niveaux d'accumulation de protéines et d'ARNm pour 106 gènes de levure en phase exponentielle de croissance (d'après Gygi et al., 1999). Les protéines analysées ont été isolées par 2-DE et choisies sur toute la gamme de poids moléculaire et de point isoélectrique. Dans l'encadré sont représentées les variations de 69% des gènes analysés dans le graphique principal. Les droites en pointillés rouges représentent les coefficients de corrélation de Pearson, dans chacun des 2 cas.

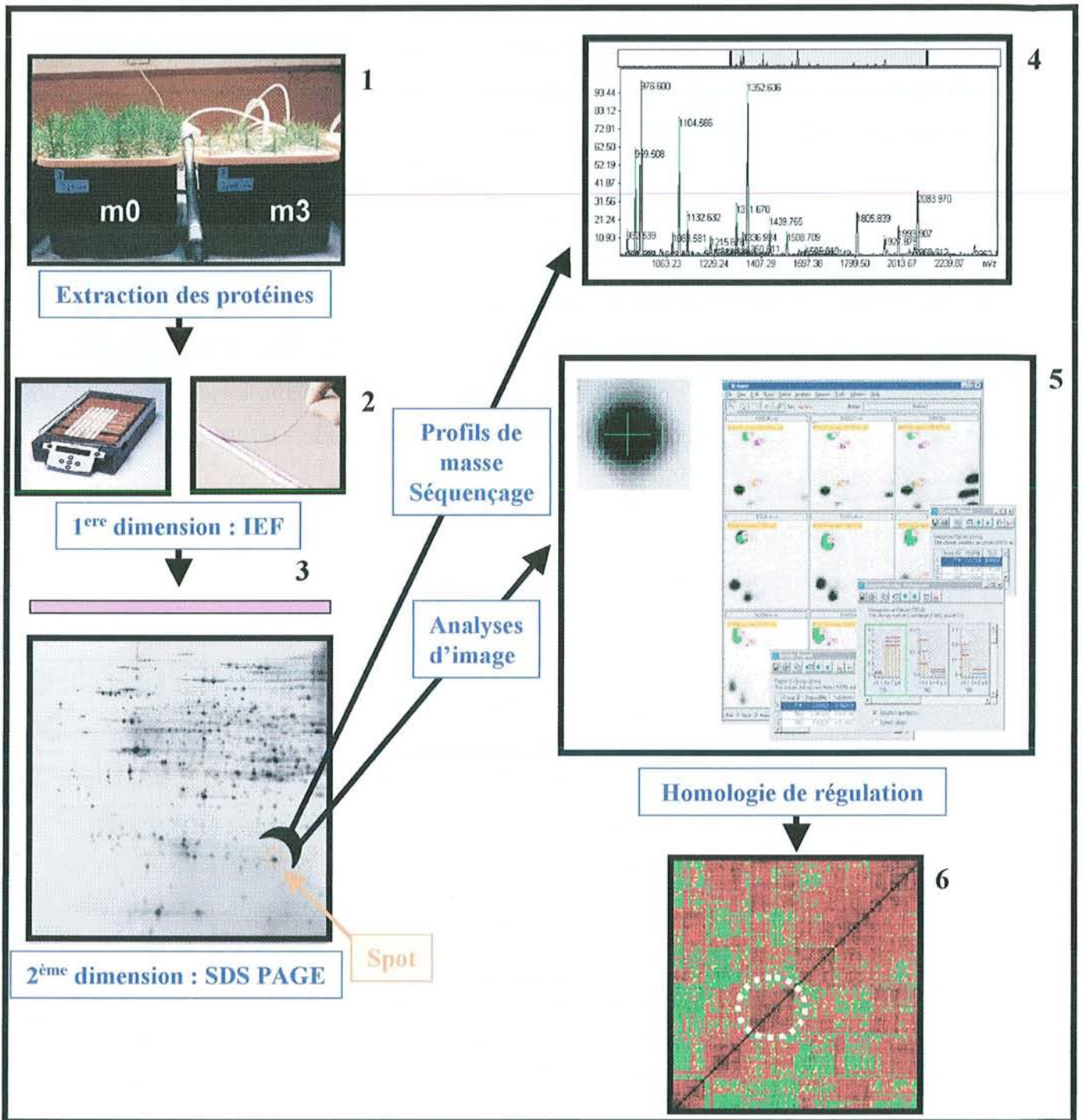
Les northern *in silico* ont été utilisés notamment chez l'homme et la souris, aussi bien en recherche fondamentale qu'en pharmacologie (Lee et al., 1995 – Okubo et al., 1995). Chez les plantes, White et al. (2000) ont utilisé cette méthode pour analyser l'expression des gènes qui sont impliqués dans le développement de graines d'*A. thaliana*. Un autre exemple, chez *Arabidopsis*, a consisté à analyser l'expression différentielle de gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des lipides (Mekhedov et al., 2000).

Ce type d'analyse est en cours chez le pin maritime parallèlement à l'étude que je décrirai ici. Quatre banques d'ADNc de plants non stressés (N) et stressés (S, déficit d'alimentation en eau) ont été réalisées pour les parties aériennes (A) ainsi que pour les racines (R). 2078 ADNc provenant des quatre banques (AN : 366 ADNc ; AS : 564 ADNc ; RN : 571 ADNc ; RS : 563 ADNc) d'une longueur moyenne de 630pb ont été séquencés, parmi lesquels près de la moitié (896 clones) correspondent à des gènes de fonction connue. Les résultats d'analyse de séquences de chacune de ces banques sont présentés à la figure 19.

## 2.2. Protéomique

### 2.2.1. Introduction

Du fait des avancées tant au niveau du séquençage qu'au niveau de l'annotation des séquences d'ADN, le domaine de la protéomique prend de plus en plus d'ampleur. Des études sur le protéome sont nécessaires pour compléter les résultats que l'on obtient par l'analyse en masse des transcrits. Ce complément d'information s'effectue à la fois par l'acquisition de séquences (aspect structural) et l'analyse des variations d'expression entre différents états physiologiques, différents stades de développement ou bien encore entre différents tissus (aspect fonctionnel). En effet, les protéines sont les acteurs finaux du fonctionnement cellulaire. Selon leur structure elles peuvent détecter, véhiculer, transformer diverses formes d'énergie (chimique, électrique, photonique, mécanique, etc.) et transférer des informations. De plus il a été montré que la corrélation entre la quantité de transcrits, la quantité de protéines, et dans le cas des enzymes, leur activité, n'est pas toujours positive (Gygi et al., 1999 ; figure 20). Par ailleurs, l'étude de l'expression des protéines permet de prendre en compte aussi bien le contrôle post-transcriptionnel que les modifications post-traductionnelles.



**Figure 21** : La protéomique. **1)** Différents tissus et/ou échantillons à analyser ; **2)** Après extraction, les protéines sont séparées selon leur point isoélectrique ; **3)** Séparation des protéines selon leur masse moléculaire ; **4)** Analyse des protéines par spectrométrie de masse, séquénçage ; **5)** Analyse d'image ; **6)** Analyses quantitatives multivariées, où la variation de chacune des protéines est analysée par rapport aux autres.

### 2.2.2. Méthodes

La technique principalement utilisée pour séparer et quantifier les protéines dénaturées est l'électrophorèse bidimensionnelle (2-DE). Son principe est établi depuis plus de 25 ans (O'Farrell, 1975) et repose sur une séparation des protéines selon deux critères de séparation indépendants (figure 21) :

1-Tout d'abord, les protéines sont séparées par focalisation isoélectrique à l'intérieur d'un gel d'acrylamide, afin de les séparer selon leur charge.

2-Ensuite, les protéines sont séparées, dans un second gel d'acrylamide (SDS-PAGE), perpendiculairement au premier, qui les séparera selon leur masse.

La résolution de la 2-DE est égale au pouvoir de résolution des deux techniques de séparation. Cette technique permet de visualiser potentiellement toutes les protéines exprimées dans une cellule. C'est une méthode de séparation quantitative qui permet de déterminer les concentrations relatives des protéines exprimées. La précision des mesures dépend de la méthode de mise en image. C'est également une méthode de séparation fiable et répétitive. Des développements techniques (Pandey and Mann, 2000) ont récemment été effectués pour augmenter la séparation et accroître la reproductivité. Les gels de première dimension font maintenant intervenir des gradients de pH immobilisés (IPG strips) à l'intérieur même du gel. Ils remplacent les ampholites qui migrent en même temps que l'échantillon (Bjellqvist et al., 1982). Ce système permet d'étudier les protéines incluses dans des gammes de pH précises afin d'accroître leur séparation, tout en augmentant la reproductibilité. Pour obtenir une séparation et une résolution maximale des protéines contenues dans un échantillon donné, on pourra alors réaliser autant de gels que de gradients de pH disponible en IPG (de 3 à 12). Les « IPG strips » permettent aussi un chargement sur toute la longueur du gel, et non à l'une des deux extrémités, ce qui rend possible la séparation de grandes quantités de protéines (de l'ordre du milligramme), nécessaires pour le micro-séquençage.

La 2-DE est enfin une technique semi-préparative dans la mesure où elle permet la caractérisation ultérieure des protéines séparées. Les différentes méthodes de caractérisation des protéines (microséquençage, spectrométrie de masse, analyse de la composition en acides

aminés, immunodétection) sont maintenant si sensibles qu'une quantité très faible de protéines suffit pour être analysée.

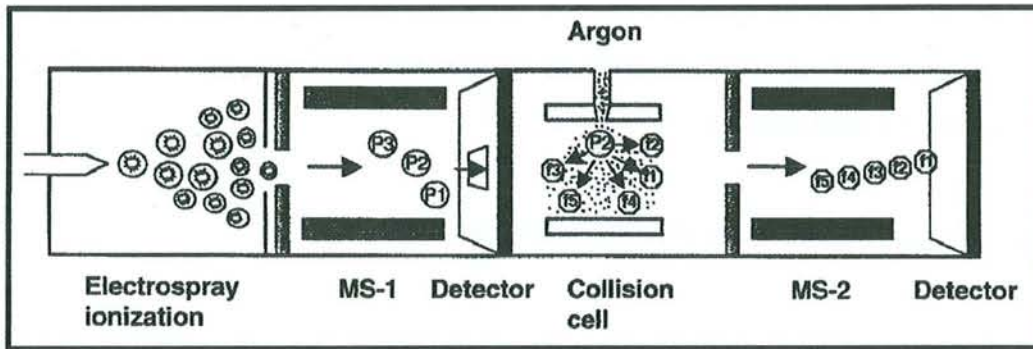
### **2.2.3. Révélation, digitalisation et traitement d'image**

Il est maintenant possible d'atteindre des seuils de sensibilité très importants pour la révélation des protéines notamment par l'utilisation de la coloration à l'argent, de la chimioluminescence ou bien encore de la fluorographie. Cette précision est d'autant plus importante lorsqu'elle est couplée à certaines technologies de détection (plaques photographiques, béta- ou phospho-Imager) et de digitalisation (caméra CCD, densitomètre laser ou scanner). Enfin il est possible par l'utilisation de logiciel de détecter et caractériser les taches protéiques. Ces analyses permettent de réaliser des cartes de synthèse, de calculer des histogrammes de densité optique pour chaque protéine ou groupe de protéines. C'est donc les avancées réalisées dans le traitement de l'image qui ont permis l'exploitation des cartes protéiques.

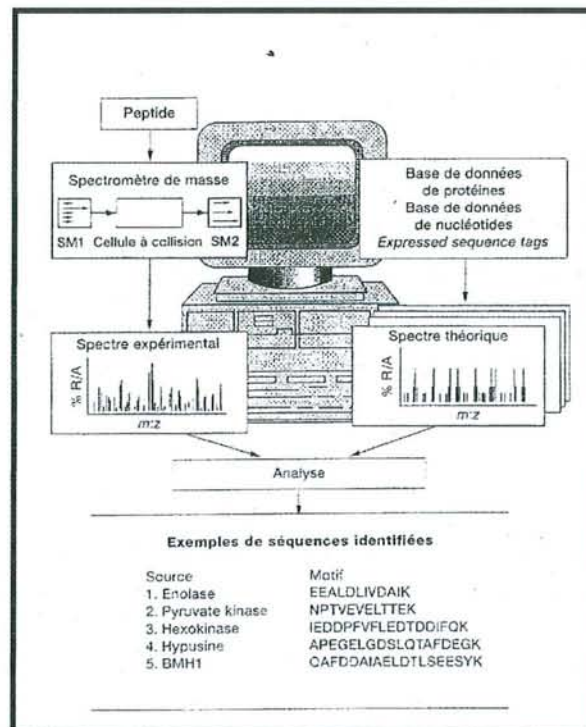
### **2.2.4. Identification des protéines**

L'identification est un aspect important de la protéomique. On passe d'une simple description de l'évolution de l'accumulation (apparition, disparition, variation d'intensité des protéines) à une véritable caractérisation. Il est alors possible d'attacher à une protéine analysée une fonction, de lui associer une famille de protéines, une localisation cellulaire, tissulaire ou de l'inclure dans une chaîne réactionnelle.

Les premières méthodes d'identification étaient très lourdes à mettre en œuvre et comprenaient les techniques d'immunodétection (coût élevé, deux ou trois protéines analysées à la fois, réactions croisées), de détermination de la composition en acides aminés (faible faisabilité, identification peu sûre ; Garrels et al., 1994), de microséquençage de acides aminés N-terminaux (problème du blocage du N-terminal, coût élevé), de séquençage de protéines entières ou digérées (digestion à l'aide de protéases ou de méthodes chimiques, coût élevé). La spectrométrie de masse a permis de franchir un palier important dans l'identification des protéines. En effet, cette technique présente l'avantage d'être très sensible et de permettre la détection des modifications post-traductionnelles pour un faible coût.



**Figure 22** : Représentation schématique du séquençage de peptide par spectrométrie de masse en tandem, d'après Li et Assmann, (2000). Après digestion de la protéine d'intérêt (ex : trypsin), les peptides sont soumis à un champ électrique intense qui va leur donner une charge et volatiliser le liquide qui les contient (*electrospray ionization*). L'échantillon passe ensuite par le premier spectromètre de masse (MS-1) où les peptides (P1, P2 et P3) sont identifiés en fonction de leur masse et de leur charge (*detector*, rapport  $m/z$ , Respectivement). Puis un peptide (P2) est isolé du mélange et fragmenté par collision avec un gaz inerte (Argon, *collision cell*). La fragmentation va produire un mélange de peptides (f1, f2, f3, f4 et f5) dont la masse diffère d'un seul acide aminé. Le second spectromètre de masse (MS-2) va analyser le rapport  $m/z$  de ces fragments peptidiques. Enfin la séquence de la protéine est reconstituée par analyse informatique.



**Figure 23** : Description de l'algorithme de recherche *Sequest*, d'après Dongré et al., (1998). Le spectre de masse expérimental est comparé avec les spectres de masse théoriques reconstruits à partir des bases de données de protéines ou de nucléotides. Ces séquences sont comparées au spectre expérimental. Ensuite les 500 meilleurs spectres expérimentaux sélectionnés sont soumis à une analyse de corrélation croisée. A l'issue de celle-ci la séquence candidate la plus probable est retenue.

Il existe deux types de sources utilisées en spectrométrie de masse, à savoir l'ESI (Electrospray Ionisation) qui est une méthode extrêmement sensible (de l'ordre de la femtomolle) et MALDI (Matrix-Assited Laser Desorption Ionisation) plus adéquate pour les grosses molécules (Patterson et Aebersold, 1995 - Haynes et al., 1998). Cependant la technique MALDI présente l'avantage d'être moins sensible à la présence de tampon ou de sels dans l'échantillon à analyser, ce qui en fait la méthode préférentiellement utilisée.

Les méthodes de spectrométrie de masse les plus utilisées sont la MALDI-TOF (*Matrix-Assited Laser Desorption Ionisation-Time of flight*), et la spectrométrie de masse en tandem (SM/SM, figure 22) associées à une source de type électrospray ou nanoélectrospray (Wilm et Mann, 1996). Le principe de chacune de ces méthodes reste le même. Tout d'abord il s'agit de déterminer la masse de la protéine (ou des différents peptides issus d'une hydrolyse chimique ou enzymatique), il est possible alors à l'aide de logiciels informatiques de déterminer d'autres paramètres caractéristiques de la protéine analysée, tel que son point isoélectrique. Pour cela les logiciels bioinformatiques vont cribler des bases de données pour déterminer si une molécule répertoriée correspond aux données expérimentales. La masse totale ne permet pas d'identifier une protéine, pour cela il est nécessaire d'obtenir l'empreinte des masses des différents peptides issus de l'hydrolyse (*peptide mass fingerprinting*, figure 23).

Ces deux techniques sont complémentaires, les spectromètres MALDI-TOF présentent un débit relativement important (plusieurs dizaines de protéines par jour) lorsque les systèmes sont automatisés. Ce système est généralement utilisé en première approche. Cette méthode peut permettre d'identifier une protéine dans la mesure où celle-ci (ou une EST) est répertoriée sur les bases de données. Dans la pratique, la méthode de Mann et al., (1996) consiste à utiliser un spectromètre de masse à grand pouvoir de séparation (0,1 Da pour un peptide <10 000Da). Les protéines à analyser (découpées directement dans le gel) subissent une digestion par la trypsine. Les spectres de masse des fragments de digestion obtenus sont comparés à ceux des bases de données (*PeptideSearch*). Ce qui permet d'obtenir une première identification de la protéine. L'identification peut être affinée par l'obtention d'un renseignement supplémentaire sur les fragments issus de la digestion tryptique. Ce renseignement supplémentaire s'obtient de deux façons : (i) par la recherche sur les profils de masse de deux fragments séparés par une masse correspondant à un acide aminé basique ce qui indique une coupure tryptique sur un doublet (KK, RR, KR) ou, (ii) en réalisant une dégradation d'Edman sur les fragments de digestion tryptique ainsi qu'un nouveau spectre de

masse pour déterminer, par comparaison avec le premier, l'identité de l'acide aminé N-terminal de chaque fragment.

Si les protéines analysées ne sont pas répertoriées, on utilise alors la MS/MS (Keough et al., 2000). Le rythme d'analyse est beaucoup plus faible (trois à quatre protéines par jour), mais permet une analyse plus fine (détermination de modifications post-traductionnelles : glycosylation, phosphorylation, etc.). Il est aussi possible de coupler la nanoélectrospray MS/MS à différentes techniques séparatives, telles que la nano/microchromatographie liquide haute performance ou à l'électrophorèse capillaire (HPLC) qui augmente la sensibilité (10 femtomoles) et produit des spectres de masse de très bonne qualité (Li et Assmann, 2000). Le couplage de la spectrométrie à la nanoélectrospray MS/MS couplée à une chromatographie HPLC est de plus en plus utilisé.

Bien que l'augmentation de la sensibilité et de la qualité des spectres de masse soit un facteur déterminant pour l'identification des protéines, il ne faut pas perdre de vue que les données obtenues par spectrométrie de masse sont toujours comparées à celles contenues dans les bases de données. Ceci implique que le succès de l'identification d'une protéine repose aussi sur le développement de logiciels bioinformatiques et de bases d'EST.

### 2.2.5. Applications

Les profils protéiques ont été très largement utilisés en protéomique dans le règne animal pour mettre en évidence l'expression de gènes particuliers dans certains tissus ou cellules, notamment dans le cadre de pathologies (mélanome : Robinson et al., 1998 – lymphome : Müller et al., 1999) ou de recherches pharmacologiques (effets de certaines molécules thérapeutiques sur des cellules cancéreuses : Myers et al., 1997). Ces travaux ont donc contribué au développement de la génomique fonctionnelle aussi bien chez l'homme que chez les microorganismes (Anderson et Anderson, 1998 - Dutt et Lee, 2000 - Chambers et al., 2000). Cette approche a aussi été appliquée avec succès aux plantes (Santoni et al., 1998 - van Wijk, 2000). Pour les arbres forestiers, on pourra citer les travaux de Costa et al. (1998) et Costa (1999) qui ont consisté à identifier et caractériser des protéines d'aiguilles de pin maritime dont l'accumulation est régulée lors d'un stress hydrique. On pourra aussi citer les travaux réalisés sur la réponse protéique du xylème de pin maritime soumis à un stress mécanique (Plomion et al., 2000).



S.C.D. - U.H.P. NANCY 1  
BIBLIOTHÈQUE DES SCIENCES  
Rue du Jardin Botanique  
54600 VILLERS-LES-NANCY

**III. Réponse moléculaire des végétaux  
soumis à un stress hydrique**

### Introduction

Au cours de leur existence la plupart des plantes sont soumises à des diminutions de leur contenu relatif en eau et sont capables de produire des structures hautement résistantes à la dessiccation tels que les graines, le pollen ou les spores. Au niveau physiologique, un déficit hydrique peut se produire lors d'une sécheresse, d'un froid ou en présence de milieux salins. La plupart des dommages au niveau intra-cellulaire, ainsi que les mécanismes liés à la résistance à ce type de stress, sont encore peu connus. De nombreuses données moléculaires, permettent cependant d'élucider les principaux mécanismes cellulaires mis en place par la plante lors d'un stress hydrique. On peut résumer les processus qui surviennent lors d'un stress hydrique selon trois grandes étapes :

- 1. une diminution de la croissance accompagné au niveau cellulaire d'une diminution du nombre de polysomes, d'un ajustement osmotique, d'une modification de l'extensibilité des parois et d'une altération du métabolisme du carbone et de l'azote.

- 2. une diminution de la photosynthèse, reliée à une augmentation du taux d'ABA et aux dommages dans les thylakoïdes. En parallèle, la transpiration diminue (fermeture des stomates) en même temps que les solutés compatibles s'accumulent.

- 3. enfin, une activation des mécanismes liés à la tolérance tels que l'accumulation de déhydrines, de *lea*, de disaccharides ou d'enzyme impliquée dans la détoxification s'opère.

La régulation de la réponse au stress ainsi que sa perception restent encore plus obscures. Là encore, des signaux de transduction impliquant l'ABA, des facteurs de transcription et certains éléments des promoteurs commencent à être caractérisés.

La tolérance à un déficit d'alimentation en eau a été largement étudiée chez les plantes selon trois stratégies basées sur l'étude de systèmes tolérants de type « graines » ou « plantes reviviscentes », de mutants provenant de plantes modèles (*Arabidopsis*), et de l'effet du stress sur des plantes de grandes cultures.

## 1. Systèmes tolérants

Les systèmes tolérants correspondent à certaines catégories de graines (Leprince et al., 1993), mais aussi à des plantes telles que *Craterostigma plantagineum* ou *Mesembryanthemum crystallinum* (Cushman et al., 1989). Une analyse moléculaire détaillée de ce type de système peut permettre de révéler des gènes particuliers pouvant contenir l'information nécessaire à une résistance accrue face à la dessiccation.

Dans un premier temps, nous verrons comment les graines passent par un étape de déshydratation poussée. Dans un second temps, nous aborderons les plantes reviviscentes qui survivent à de longues périodes de sécheresse. Enfin nous aborderons les modèles génétiques, qui reposent sur l'analyse de mutants hypersensibles ou résistants au stress hydrique, ainsi que les modèles qui reposent sur des études en conditions naturelles.

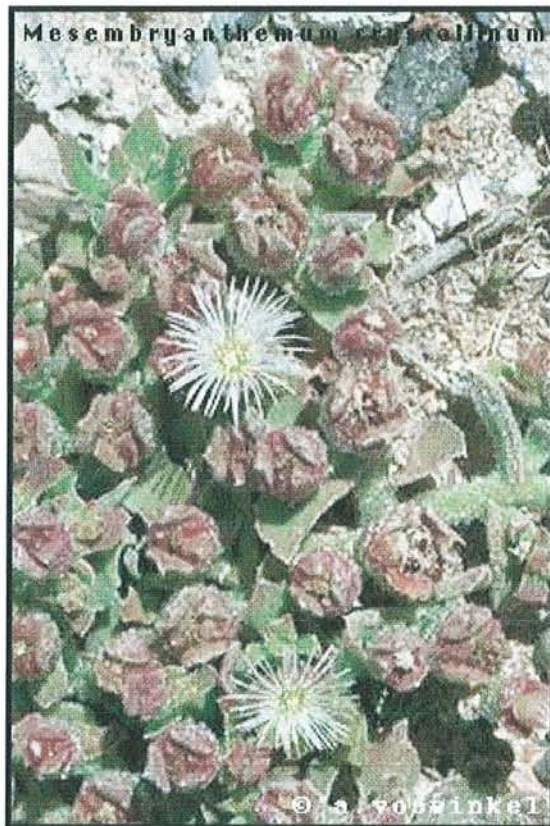
### 1.1. Les graines

Lors de leur maturation, les graines peuvent perdre jusqu'à 90% de leur contenu en eau avant d'atteindre le stade de dormance (absence d'activité du métabolisme). Cet état leur permet de survivre à des conditions extrêmes (ex : hiver) et de favoriser la dispersion de l'espèce. Cependant, cette tolérance est perdue dès que la germination se met en place. Des graines de nombreuses espèces ont fait l'objet d'études approfondies, telles que *Arabidopsis thaliana* (Parcy et al., 1994), le coton (*Gossipium hirsutum*, Baker et al., 1988), l'orge (*Hordeum vulgare*, Espelund et al., 1995), le maïs (*Zea mays*, Pagès et al., 1993), le ricin (*Ricinus communis*, Han et Kermodé, 1996) et le riz (*Oryza sativa*, Mundi et Chua, 1988). Un des problèmes majeurs de ce type de système est d'arriver à dissocier les gènes impliqués dans la tolérance de ceux impliqués dans le développement.

Une des découvertes majeures liées à l'utilisation de ce type de système sont les protéines LEA (Late Embryogenesis Abundant). Les ARNm de ces protéines apparaissent dès le début de la déshydratation des graines et sont accumulés jusqu'à leur maturation, pour devenir au final la population de messagers la plus abondante dans les tissus déshydratés. La quantité de ces ARNm diminue quelques heures après la réhydratation de l'embryon (Han et Kermodé, 1996).



A



B

**Figure 24** : Systèmes tolérants. **A** : *Craterostigma plantagineum* ;  
**B** : *Mesembryanthemum crystallinum*.

### 1.2. Les plantes reviviscentes

Ces plantes sont capables de survivre lors de sécheresses extrêmement sévères, c'est-à-dire lorsque le contenu relatif en eau des protoplastes est inférieur à 2%.

Chez *C. plantagineum* (figure 24.A.), il a été observé que les modifications moléculaires permettant la tolérance au stress hydrique impliquaient des remaniements aussi bien au niveau des transcrits qu'au niveau des protéines. Cette plante modèle pour l'étude de la tolérance au stress hydrique présente le double avantage de pouvoir être étudiée aussi bien dans son ensemble qu'en culture cellulaire, mais aussi d'exprimer une réponse moléculaire indépendamment des processus liés au développement (notamment par rapport aux graines).

Une autre plante modèle fréquemment étudiée est la plante des glaces *M. crystallinum* (figure 24.B.). Cette plante présente la particularité de survivre à un froid intense qui, comme nous l'avons vu précédemment, induit aussi un stress hydrique au niveau physiologique.

Les auteurs ont montré que les principaux gènes induit par le stress hydrique dans les tissus végétatifs de ces espèces modèles sont similaire à ceux exprimés dans les graines d'autres espèces.

### 1.3. Modèles génétiques

Ces systèmes présentent l'avantage d'être très bien détaillés sur le plan génétique, et de posséder de nombreux mutants. On pourra notamment citer la découverte de mutants qui ont permis de définir l'implication de l'ABA dans la tolérance au stress hydrique, comme le mutant *flacca* chez la tomate (*Lycopersicum esculentum*, Cohen et Bray, 1990), et le mutant *droopy* chez la pomme de terre (*Solanum tuberosum*, Quarrie, 1982). De nombreux mutants pour l'ABA ont été isolés chez *Arabidopsis*, et ont permis d'élucider certains aspects de la réponse moléculaire au stress hydrique liés à ce facteur de croissance. Grâce aux informations génétiques détaillées dont on dispose pour *Arabidopsis* et au clonage positionnel, deux facteurs de transcription ont été isolés, correspondant à un activateur des messagers codants pour des LEA (ABI3, Giraudat et al., 1992), et à une phosphatase régulée par le calcium (ABI1, Leung et al., 1994). Ces modèles sont donc très intéressants car ils présentent

l'avantage de permettre l'étude *in vivo* du rôle d'un gène pour une condition physiologique déterminée, comme la déficience d'alimentation en eau.

### 1.4. Plantes de grandes cultures

Ces systèmes présentent l'avantage de mettre à disposition différentes lignées qui présentent des degrés différents de tolérance au stress hydrique. Ainsi, il est possible d'établir des corrélations entre le degré de tolérance et le niveau d'expression des gènes qui sont supposés être impliqués dans cette tolérance. De plus, le type de stress que subissent les plantes de grandes cultures est le plus proche de celui que les plantes rencontrent généralement dans leur milieu naturel. L'étude de ces systèmes peut donc permettre une approche complète de la tolérance au stress hydrique. Cependant, ces expériences restent très lourdes à mettre en œuvre, de par la nécessité de disposer de plantations avant toute analyse moléculaire.

### 2. Gènes régulés au cours du stress

Bien que l'ensemble des trois systèmes précédents permette d'acquérir des données sur le plan moléculaire, les deux systèmes les plus efficaces, pour comprendre les mécanismes moléculaires de la tolérance, restent les plantes modèles (*C. plantagineum* et *M. crystallinum*) et les plantes de grandes cultures (riz, maïs, etc.). Deux approches sont pour cela préférentiellement utilisées. La première consiste à étudier certains enzymes impliqués dans des voies métaboliques particulières. La seconde consiste à identifier des gènes exprimés de manière différentielle chez des plants élevés dans des conditions de croissance normale ou ayant subi un stress hydrique. Ces expériences ont permis d'identifier avec succès de nombreux gènes de fonctions connues. Les paragraphes suivants font la synthèse des changements observés au niveau de l'expression des gènes au cours du stress hydrique.

#### 2.1. Métabolisme

Les changements qui se produisent au niveau du métabolisme primaire font partie de la réponse générale au stress. En effet, de nombreux gènes qui varient au cours du stress hydrique varient de la même manière pour d'autres stress environnementaux (Deepika et Anil, 1999). Cependant, certaines voies particulières sont directement reliées à des phénomènes précis de la réponse au stress hydrique et seront détaillées plus tard.

Parmi les gènes qui varient au cours du stress, on pourra citer par exemple la sous-expression de gènes impliqués dans la photosynthèse. Ces gènes sont par exemple impliqués dans l'assimilation du CO<sub>2</sub> (la petite sous unité de la rubisCO) ou dans la perception des photons (protéines Cab : chlorophyll a/b binding protein, Bartholomew et al., 1991 – Blomstedt et al., 1998).

Chez les Crassulacées, l'induction des gènes codants pour la phosphoénolpyruvate carboxylase montre l'importance du métabolisme CAM dans la limitation des pertes en eau liées à l'assimilation du CO<sub>2</sub>. Ce type de métabolisme correspond à une réponse majeure de nombreuses plantes pour survivre dans des conditions de milieu très sec (Vernon et al., 1993 – Cushmann et al., 2000).

Le métabolisme azoté est lui aussi affecté par le déficit hydrique. Bauer et al. (1997) ont mis en évidence chez la tomate l'accumulation d'un transcrite au cours du stress hydrique. Le transcrite isolé codait pour une glutamine synthase cytosolique (GS1). Cette accumulation semble être reliée au remaniement (« turn-over ») des protéines foliaires suite à la fermeture des stomates.

Il en est de même pour le métabolisme énergétique. Umeda et al. (1994) ont étudié les variations des transcrits correspondant aux enzymes impliqués dans la formation de l'ATP chez des plants de riz soumis à un déficit hydrique, et ont montré une induction coordonnée de la transcription des gènes impliqués dans cette voie métabolique.

On pourra aussi citer les gènes impliqués dans le métabolisme des groupements méthyles activés. Ces groupements sont importants dans la méthylation de nombreuses molécules (ex : ADN, lignines). Ainsi, plusieurs études ont fait état d'une sur-expression des gènes codants pour des SAM synthetase (S-adenosyl methionine) lors du stress hydrique. Chez *Pinus taeda*, Chang et al. (1995) ont montré une sur-expression de la SAM synthase aussi bien dans les racines, les tiges et les aiguilles de plants stressés.

Ces résultats montrent que le stress hydrique a un impact direct sur le métabolisme primaire, et qu'il induit des remaniements profonds au niveau de l'expression des gènes.

### 2.2. Ajustement osmotique

Lors d'un stress hydrique de faible intensité, le potentiel hydrique de la plante peut être maintenu par un ajustement osmotique. Cet ajustement implique l'accumulation, au niveau cellulaire, de sucres, d'acides aminés, d'ions ou d'autres solutés compatibles (c'est-à-dire non toxiques). L'accumulation d'osmolites permet de créer un influx d'eau dans la cellule ou tout du moins d'éviter un éflux, en augmentant la force de rétention des molécules d'eau. Le maintien de cette quantité d'eau permet ainsi de conserver la turgescence nécessaire à la croissance des cellules. Il semblerait que cette accumulation d'osmolites soit reliée au maintien de l'intégrité des protéines et des membranes (Crowe et al., 1992). Kumar et Dubey (1999) ont par exemple montré que la structure d'une glutamine synthase de riz était fortement maintenue en présence de glycine-bétaïne, lors d'un stress hydrique. L'accumulation d'osmolites semblerait aussi reliée à la protection des cellules contre les espèces activées de l'oxygène (Rhodes et Hanson, 1993). Cependant, une augmentation d'osmolites n'est pas toujours reliée à une augmentation de la tolérance (Maggio et al., 1997). Nous ne développerons pas ici les processus impliqués dans l'accumulation des sucres qui feront l'objet d'un paragraphe spécifique.

Parmi les facteurs impliqués dans cette accumulation, on pourra citer par exemple l'induction des gènes impliqués dans la synthèse d'acides aminés, tels que la proline ( $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate synthétase : P5CR) ou la glycine-bétaïne (bétaïne aldéhyde déshydrogénase : BADH). L'augmentation de transcrits de la P5CR, corrélée à une augmentation de proline, a été montrée chez *Arabidopsis* (Savouré et al., 1995 – Yoshida et al., 1995 - Peng et al., 1996 - Kiyosue et al., 1996). De plus, ces auteurs ont montré que cette augmentation était directement reliée à l'application du stress. En effet, lors de la phase de récupération juste après l'application du stress, le contenu en proline diminue en même temps que la quantité de transcrits correspondant à la P5CR. L'induction de ce gène est directement relié à la régulation du taux de proline dans les cellules, en fonction du stress. Sur des plants transgéniques de tabac (*Nicotiana tabacum*) contenant un gène codant une BADH d'orge, Ishitami et al., (1995) ont mis en évidence la sur-expression du transcrit correspondant, lors d'un stress hydrique (sel et sécheresse) ou après traitement à l'ABA. Cette augmentation de transcrit était multipliée par huit dans les feuilles et par 2 dans les racines.



Les composés inorganiques peuvent aussi avoir un effet dans la régulation osmotique et dans la tolérance à la sécheresse. Il semblerait même que ce type de molécule soit plus efficace que les composés organiques. En effet leur concentration peut être très élevée dans la vacuole et l'apoplaste pour un coût énergétique très faible (Hare and Cress, 1997). La compartimentation des ions fait appel à un gradient électrochimique lié aux protons ( $H^+$ ). Il a été montré par Niu et al, (1993) que la sous-unité de 70-KDa d'une ATPase de la membrane plasmique et du tonoplaste était régulée par un stress salin. Sur des plantules de pin maritime (*Pinus pinaster*) soumises à un stress salin, Nguyen-Queyrens et al., (1995) ont montré qu'il y avait au niveau racinaire une accumulation plus importante d'ions  $K^+$  chez la race tolérante au stress hydrique (Tamjout) par rapport à la race sensible (Landaise). Une accumulation de transcrits codants pour des transporteurs ioniques a été démontrée aussi bien chez *Arabidopsis* que chez le pois (*Pisum sativum*). Ces transporteurs favorisent le déplacement de sels entre les compartiments de la cellule (Yamaguchi-Schinozaki et al., 1992).

De la même manière que les canaux ioniques transportent des ions, les canaux hydriques présentent eux aussi une importance dans la régulation du potentiel osmotique de la cellule, *via* la régulation du flux hydrique. Peu d'études ont porté sur l'expression de ce type de gènes au cours du stress hydrique. Cependant, chez *Atriplex canescens* un transcrit sur-exprimé au cours du stress hydrique et codant pour une aquaporine a été isolé (Cairney et al., 1995). Cette halophyte présente la particularité de pouvoir pousser en milieu salin et donc de tolérer un stress hydrique important, phénomène dans lequel semble impliquée cette aquaporine. Barrieu et al. (1999) ont eux aussi isolé un ADNc codant pour une aquaporine qui est sur-exprimée au cours d'un stress hydrique chez *Brassica oleracea*. Ces auteurs ont montré que cette protéine était essentiellement présente dans les méristèmes. Au niveau intra-cellulaire, une accumulation de cette protéine a été observée au niveau des vésicules issues de la fragmentation du tonoplaste. Ces modifications membranaires induisent une augmentation de la conductivité hydraulique des cellules déshydratées, ce qui permet de faciliter la réhydratation et une reprise de croissance rapide. Cette idée est confortée par la diminution rapide de ce transcrit lors de la réhydratation.

### 2.3. Ajustement structural

Une des principales modifications structurales, observée sur des plantes ayant subi un déficit d'alimentation en eau, concerne l'altération des propriétés physico-chimiques des parois cellulaires. Ces changements peuvent être induits par des modifications au niveau des enzymes impliquées dans la biosynthèse des monolignols ou dans leur assemblage dans la paroi (Dixon et Paiva, 1995). L'augmentation de l'expression de ces gènes peut être reliée à l'arrêt de la croissance, et à l'épaississement de la paroi. Un autre composant majeur de la paroi correspond aux composés issus de la polymérisation des sucres (cellulose et hemicellulose). Xu et al. (1996) ont mis en évidence des modifications au niveau de l'hemicellulose *via*, notamment, la modulation de l'expression d'une famille multigénique appelée XET (xyloglucane endo-trans-glucanase). Les XET effectuent des coupures internes dans les polymères de xyloglucanes, pour ensuite lier les fragments générés à d'autres chaînes de xyloglucanes. Braam et al. (1997) ont proposé l'idée qu'à l'instar des gènes impliqués dans la lignification, les XET pourraient intervenir dans l'altération des propriétés (ex : extensibilité) de la paroi lors des stress abiotiques et notamment hydriques. Enfin, d'autres transcrits codants pour des protéines impliquées dans la paroi ont été caractérisés comme étant sur-exprimés au cours du stress hydrique. Chez le soja (*Glycine max*) Creelman et Mullet, (1991) ont montré l'accumulation de transcrits correspondant à des GRP (protéines riches en glycine), des PRP (protéines riches en proline) ou encore à l'expensine (HRGP : glycoprotéines riches en hydroxyproline).

Des changements structuraux au niveau du cytosquelette peuvent également s'opérer. Creelman et Mullet, (1991) ont aussi mis en évidence une diminution de l'expression de deux gènes chez le soja. Le premier codait pour une  $\beta$ -tubuline, une protéine impliquée dans les phénomènes de croissance cellulaire. Le second codait pour l'actine, une protéine impliquée dans la structure du cytoplasme et dans l'orientation des organelles. De la même manière, il a été montré que la division cellulaire de levures (*Saccharomyces cerevisiae*) était inhibée lors d'un stress osmotique, et était directement corrélée à une inhibition du gène codant pour l'actine (Chowdhury et al., 1992). Ainsi, ces deux transcrits peuvent rendre compte des phénomènes d'inhibition de la croissance et des remaniements cytoplasmiques qui se produisent lors d'un déficit hydrique.

Chez *C. plantagineum*, il a été observé une augmentation des ARNm correspondant aux gènes ELIP (Bartels et al., 1992). Ces gènes sont induits par la lumière et jouent un rôle dans l'assemblage des photosystèmes. Pendant un stress, les chloroplastes subissent des changements morphologiques au cours desquels les protéines ELIP permettent de maintenir l'assemblage des photosystèmes et des pigments, structures essentielles à la résurrection. Des résultats identiques ont été observés chez *Sporobolus stapfianus*, une autre plante reviviscente (Neale et al., 2000).

### 2.4. Dégradation et réparation

De nombreuses protéines présentant des similarités avec des protéases ont été isolées suite à une induction par un stress hydrique. Chez le colza (*Brassica napus*) Stroehrer et al., (1997) ont mis en évidence la sur-expression d'une protéase à cystéine. Une protéase à cystéine a aussi été isolée chez *M. crystallinum* lors d'un stress salin (Forsthoefel et al., 1998). Cette induction semble avoir pour rôle d'éliminer les protéines redondantes et de dépolymériser les polypeptides de stockage présents dans la vacuole (Alamillo et Bartels, 1996, Bauer et al., 1997). Les acides aminés issus de cette dégradation peuvent alors être réutilisés pour la synthèse de nouvelles protéines. Il semblerait aussi que certaines de ces protéases aient un rôle dans la réponse au stress oxydatif qui fait suite à la diminution de la photosynthèse (No et al., 1997).

Une augmentation de transcrits codants pour l'ubiquitine a également été observée chez des plants adaptés au polyéthylène glycol ou à un milieu salin (Borkird et al., 1991). L'ubiquitine est une protéine impliquée dans la protéolyse. Chez la plante tolérante à la sécheresse *S. stapfianus*, un transcrit codant pour l'ubiquitine a été isolé et son expression varie au cours du stress hydrique, avec une augmentation dans la phase de déshydratation ainsi que dans la phase de réhydratation (O'Mahony et Olivier, 1999). Cette variation d'expression a aussi été décrite chez d'autres espèces (Belknap et Garbarino, 1996). Le maintien des processus de dégradation, au cours du stress, des protéines *via* l'augmentation de l'expression de l'ubiquitine semble lié au phénomène de tolérance à la déshydratation.

*A contrario*, Lopez et al, (1994) ont isolé chez le radis (*Raphanus sativus*) un transcrit correspondant à un inhibiteur de protéase induit au cours du stress. Des études sur d'autres plantes ont aussi montré l'accumulation de messagers correspondant à des inhibiteurs de

protéases, corrélée à une augmentation de l'activité d'inhibition de la protéolyse, comme par exemple chez *Brassica oleracea* ou chez le pois (Welham et al., 1998 – Annamalai et Yanagihara, 1999).

Au cours du stress hydrique, certains résidus protéiques peuvent subir des modifications (ex : déamination, isomérisation, oxydation). Il semblerait que des enzymes impliquées dans la réparation des protéines soient sur-exprimées pendant ce stress. C'est le cas chez les mousses où il a été observé une augmentation de la L-isoaspartyl transférase, qui peut convertir les résidus L-isoaspartyl dans les protéines endommagées en L-aspartyl (Mudgett et Clarke, 1994). Ces auteurs ont aussi proposé que ce type de mécanisme pouvait avoir une importance lors du stress lorsque le « turn-over » des protéines était inhibé. Il a en effet été montré chez *Escherichia coli* que le taux de survie était plus faible pour des bactéries en phase stationnaire de croissance (« turn-over » ralenti) que pour des bactéries en phase exponentielle (« turn-over » rapide).

Ces résultats mettent en évidence les profonds remaniements qui se produisent au niveau des protéines, lors d'un déficit hydrique.

### 2.5. Détoxication

De nombreuses études ont montré que les enzymes correspondant à l'élimination des composés intermédiaires du métabolisme de l'oxygène sont sur-exprimées au cours du stress hydrique, et jouent probablement un rôle très important dans la tolérance. En effet, la diminution du contenu relatif en eau dans les feuilles provoque la fermeture des stomates, qui induit une diminution de l'assimilation du CO<sub>2</sub> et une augmentation de la concentration en espèces activées de l'oxygène. Cependant, l'activation des gènes impliqués dans ce métabolisme est commun à différents types de stress dès lors qu'une diminution de l'activité photosynthétique est observée. De plus, l'augmentation de la photorespiration induit une activation de l'activité transcriptionnelle et enzymatique de la glycolate oxydase, provoquant la formation d'eau oxygénée (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) et réduisant ainsi la capacité de survie des plants lors du stress (Zhou et Ye, 1999). Tout ceci peut expliquer pourquoi les gènes codants pour les enzymes impliqués dans la détoxication des cellules sont induits au cours du stress hydrique (Eshdat et al., 1997).

Une induction des transcrits codants pour deux superoxyde dismutase (Mn-SOD et Cu/Zn-SOD) a été mise en évidence sur des plants de riz soumis à la sécheresse, au froid et à un stress salin (Kaminaka et al., 1999). Les auteurs ont aussi montré que seule la Mn-SOD était induite par l'ABA. Au cours de cette expérience, une autre SOD (à Fe) a été caractérisée comme présentant une sous-expression. Ces résultats montrent la complexité des phénomènes de régulation au niveau de cette étape de détoxication de la cellule.

Une autre étude menée chez le pois a montré une induction concomitante de la quantité de transcrits pour une Cu/Zn-SOD, une L-ascorbate peroxydase et une catalase au cours d'un déficit hydrique. Cette co-induction apparaît comme directement reliée à une augmentation de la résistance de la conductivité stomatique (Mittler et Zilinskas, 1994). Sur un génotype tolérant de la même espèce, Hernandez et al., (2000) ont montré une co-induction des transcrits codants pour deux SOD (à Cu/Zn et à Mn) et une glutathione peroxydase au cours d'un stress salin prolongé. Ces résultats suggèrent que l'induction des processus de détoxication se fait de manière couplée entre différents types d'enzymes et est une composante essentielle pour la tolérance à un stress hydrique, notamment à long terme.

### 2.6. Protéines LEA

Les LEA constituent une famille multigénique dont la majeure partie des protéines sont cytosoliques et hydrophyles (Dure et al., 1989 – Garay-Arroyo et al., 2000). Des transcrits codants pour des protéines LEA ont été isolés dans les tissus végétatifs de plants soumis à un stress hydrique et ont été caractérisés comme étant sur-exprimés en condition de stress hydrique chez de nombreuses espèces de monocotylédones (ex : *Oryza sativa*, Moons et al., 1997) et de dicotylédones (ex : *Solanum chacoense*, Silhavy et al., 1995 ; *Phaseolus vulgaris*, Colmenero-Flores et al., 1997 ; *Ricinus communis*, Han et al., 1997). Cependant, aucune étude n'a encore fait état de la présence de cette famille de protéines chez les conifères.

De par leur forte concentration au sein des cellules de plants stressés et de par leur composition en acides aminés, elles ne semblent pas avoir de fonction enzymatique. Ces protéines sembleraient entretenir des liaisons avec les molécules d'eau pour assurer une hydratation minimale au sein de la cellule (une déshydratation totale étant létale). En effet, McCubbin et Kay (1985) ont montré que la protéine LEA Em de blé (*Triticum aestivum*) était considérablement plus hydratée que la plupart des protéines globulaires.

Un autre mode d'action a été proposé pour les LEA. En effet, lorsque les plantes subissent un stress violent, les composés cellulaires ont tendance à se cristalliser, provoquant de nombreux dommages au sein de la cellule. Ce phénomène peut être contre-carré par les LEA, qui peuvent agir comme des solutés compatibles pour augmenter la viscosité du milieu intracellulaire, et ainsi éviter sa cristallisation. L'intégrité des structures cytoplasmiques pourrait donc être maintenue au cours du déficit d'alimentation en eau (Koster, 1991).

Les travaux portant sur la tomate ont mis en évidence une protéine LEA de type hydrophobe, dont le transcrit est accumulé sous l'action de la sécheresse et en réponse à l'ABA (Zegzouti et al., 1997). Ce type de LEA représente une nouvelle classe dont la fonction reste inconnue.

### 2.7. Métabolisme des sucres

Le potentiel osmotique peut être maintenu pour un stress hydrique de faible ou moyenne intensité, par ajustement osmotique. Les sucres peuvent servir de composés solubles compatibles pour cet ajustement osmotique, comme de nombreuses autres molécules (proline, glycine-bétaine ou pinitol). Ainsi, les enzymes liés au métabolisme des sucres semblent avoir une importance majeure dans la tolérance au stress hydrique.

L'implication des sucres dans la tolérance au stress hydrique a été mise en évidence de par les corrélations observées entre le contenu en certains sucres et l'acquisition de la tolérance. Ces corrélations ont été observées chez les animaux, les plantes, les levures et les bactéries. Le tréhalose semble être le sucre le plus efficace en terme d'osmoprotection et en terme de minimum de quantité requise pour obtenir un effet positif (Garcia et al., 1997). Cependant, ce sucre est extrêmement rare et/ou faiblement synthétisé chez les plantes.

De nombreuses études ont mis en évidence l'accumulation de sucres solubles lors de la dessiccation. Une idée principale en ressort : différents sucres solubles peuvent être présents dans des tissus bien hydratés, mais le saccharose est préférentiellement accumulé dans les tissus en déshydratation. Un exemple frappant a été montré à partir de feuilles de *C. plantagineum* où le sucre majeur (2-octulose) dans les tissus bien hydratés (représentant 90% des sucres présents) est transformé en saccharose lors d'un stress hydrique. Le saccharose représente alors 40% du poids sec (Bianchi et al., 1991). Chez cette même espèce, l'induction

lors d'un stress hydrique des messagers codants pour la sucrose synthase (Susy) semble indiquer que l'accumulation du saccharose est régulée au niveau transcriptionnel (Kleines et al., 1999). Déjardin et al. (1999) ont aussi démontré l'existence d'un gène codant pour une Susy qui est spécifiquement induite au cours du stress hydrique chez *Arabidopsis*. Cette augmentation semble directement reliée à la diminution du potentiel hydrique au sein de la cellule.

L'accumulation des sucres semble induire la gélification du contenu cellulaire en saturant le milieu intra-cellulaire. Ce phénomène permet d'éviter la cristallisation des molécules contenues dans la cellule, et donc limite les dommages au niveau des structures cellulaires (ex : protéines, membranes). De plus comme les mouvements intracellulaires requis pour les mécanismes biochimiques sont inhibés, cela permet de maintenir un état quiescent stable. Ce mécanisme a été proposé suite à une étude portant sur des graines de maïs (Williams et Leopold, 1989).

Les mécanismes par lesquels les protéines sont stabilisées par les sucres sont mieux compris que les mécanismes de stabilisation des membranes. La spectrométrie infrarouge a permis de mettre en évidence que le tréhalose se liait aux protéines par des liaisons hydrogènes entre ses groupements hydroxyles et les résidus polaires des protéines. Une expérience *in vitro* a montré que le saccharose, le maltose et le tréhalose stabilisaient l'activité enzymatique d'une phosphofructokinase lors de la déshydratation (Carpenter et al., 1987). En effet, cette enzyme est composée de quatre sous-unités (tétramère) qui sont dissociées de manière irréversible lors d'un stress hydrique.

Les sucres peuvent aussi intervenir dans la protection des structures membranaires. Crowe et al., (1983) ont montré, *in vitro*, après déshydratation et réhydratation des membranes du réticulum endoplasmique, que les vésicules avaient tendance à fusionner et à perdre l'aptitude à transporter le calcium. Cependant, l'ajout de tréhalose à des concentrations équivalentes à celles que l'on observe lors d'un stress hydrique préserve la fonctionnalité des vésicules. Le même mécanisme que celui utilisé pour la stabilisation des protéines semble être impliqué pour la protection des membranes. En effet, au cours de la déshydratation, les groupements hydroxyles du tréhalose peuvent former des liaisons avec les groupement phosphate des lipides membranaires. Il a été aussi proposé que le saccharose se liait aux membranes entre les groupements phosphates dans les membranes déshydratées. D'autres études ont montré *in vitro*

le rôle des sucres dans la protection des membranes (Crowe et al., 1992), ce qui suggère que les sucres miment l'action de l'eau en période de déshydratation pour conserver les propriétés physico-chimiques des membranes.

Enfin, les sucres peuvent avoir un impact sur la régulation de l'expression des gènes. En effet, certains gènes sont directement régulés par le taux de glucose dans la cellule. On pourra citer par exemple le gène codant pour la protéine GRR1 (glucose regulated repressor) isolé chez *S. cerevisiae* qui est impliqué dans les cascades de transduction qui font intervenir le glucose. La protéine GRR1 joue aussi un rôle dans la dégradation des protéines ubiquitinilées. Enfin, GRR1 intervient dans la régulation du cycle cellulaire *via* la dégradation des cyclines Cln1 et Cln2 spécifiques de la phase G1 (Barral et al., 1995; Ning Li and Johnston, 1997).

### 3. Régulation des gènes lors du stress hydrique

L'expression des gènes en réponse à un déficit hydrique fait intervenir une cascade de transduction du signal extrêmement complexe qui peut être divisée en plusieurs étapes. La perception du stimulus, implique l'amplification et l'intégration du signal qui va réguler l'expression des gènes.

Peu de données sont disponibles concernant la perception du signal, bien que la variation de la turgescence ait été proposée comme un signal physique possible. Au niveau moléculaire, Urao et al. (1999) ont identifié chez *A. thaliana* une protéine membranaire (AtHK1) qui intervient dans la perception du stress hydrique. Cet osmosenseur est essentiellement présent au niveau des membranes racinaires en condition normale de croissance, et y est fortement accumulé au cours d'un stress hydrique. Il semblerait que cet osmosenseur soit directement relié à une cascade de transduction du signal, faisant intervenir des MAP-kinases.

Un modèle de choix pour l'étude de la transduction du signal est la levure (*S. cerevisiae*). En effet cet eucaryote unicellulaire possède les mêmes types de signaux de transduction que ceux présents chez les eucaryotes supérieurs. Maeda et al. (1994 et 1995) ont par exemple isolé des osmosenseurs (récepteurs membranaires) qui interviennent dans la régulation de MAP-kinase, enzymes impliquées dans la transduction du signal.

Les hormones peuvent elles aussi être impliquées dans la transmission du signal. L'augmentation du niveau d'ABA endogène est une caractéristique d'un état de stress hydrique chez de nombreuses espèces. De nombreux gènes induits par l'ABA ont été identifiés. Cependant, tous les gènes qui répondent au stress hydrique ne sont pas forcément



induits par l'ABA. Il existe donc deux types d'inductions, l'une ABA dépendante et l'autre ABA indépendante.

Nous abordons dans les paragraphes suivants comment s'opère la régulation de l'expression des gènes au cours du stress hydrique, au niveau de l'ADN génomique, des promoteurs, des molécules impliquées dans la signalisation du stress, et des modifications post-transcriptionnelles et post-transcriptionnelles.

### 3.1. Régulation au niveau de l'ADN génomique

L'accessibilité de l'ADN génomique joue un rôle très important dans la régulation de la transcription. En effet, l'ADN génomique est une molécule dynamique qui subit des modifications organisationnelles et structurales en réponse aux stimuli.

Une des modifications épigénétiques, fait intervenir la méthylation de certaines portions du génome. Il a par exemple été montré une augmentation de 16% du taux de méthylation de l'ADN génomique sur des cultures cellulaires de pomme de terre soumises à un stress salin (Sabbah et al., 1995). L'implication de ces modifications dans l'expression des gènes au cours d'un stress hydrique a par exemple été mise en évidence pour le gène codant pour la grande sous-unité de la rubisCO, dans des feuilles de colza. Minati et Johnson-Flanagan (1998) ont analysé le niveau d'expression de ce gène et celui de la quantité de protéine correspondante dans des feuilles de plants acclimatés à un stress froid, comparé à celles de plants non acclimatés. Ils ont mis en évidence une diminution de la quantité de protéine présente dans les feuilles matures de plants acclimatés. Cependant, l'accumulation de la protéine reste plus forte que celle du transcrit. Une analyse des profils de restriction de la grande sous-unité de la rubisCO, au niveau de l'ADN génomique, a permis de mettre en évidence des différences de méthylation induites par l'acclimatation au froid qui semblent impliquées dans la variation de l'expression du transcrit.

Les histones jouent un rôle dans la condensation de l'ADN ainsi que dans la régulation de l'expression des gènes en modulant l'accessibilité de l'ADN (Spencer and Davie, 1999). De nombreuses études ont montré des variations d'expression pour différents types d'histone au cours d'un déficit hydrique et/ou en réponse à l'ABA (Croston et al., 1991 - Wei and O'Connell, 1996 - Deuleu et al., 1999). Bray et al. (1999), ont par exemple isolé chez la

tomate une histone H1 qui est accumulée au cours d'un stress osmotique (polyéthylène glycol) et qui semble impliquée dans la régulation de la transcription au cours du stress.

### 3.2. Etude des promoteurs

Les nombreux changements dans les niveaux des ARNm lors du stress hydrique sont le reflet d'activation ou d'inactivation de la transcription. Comme nous l'avons vu précédemment, l'ABA peut intervenir dans ces changements d'expression. De nombreuses études ont été réalisées afin de définir les éléments en cis et trans qui sont impliqués dans l'activation des gènes par cette hormone. Il existe des séquences régulatrices particulières telles que les séquences ABRE (ABA Responsive Element, Marcotte et al., 1989) qui interviennent dans la régulation de l'expression de certains gènes. Lors d'un stress hydrique, la production d'ABA stimule l'expression de facteurs de transcription qui vont se fixer sur ces courtes séquences nucléotidiques (Mundy et al., 1990 - Chaudhary et Crossland, 1996). La transcription des gènes correspondants est alors activée.

Un autre type de séquences régulatrices directement reliées au stress mais indépendantes de l'ABA a également été mis en évidence. Il correspond au motif DRE (Dehydration Responsive Element, Yamaguchi-Shinozaki et Shinozaki, 1994).

Les séquences régulatrices ABRE et DRE peuvent être situées sur le même promoteur et induire de manière différentielle l'expression des gènes, en fonction de l'intensité et de la durée du stress. Chez *Arabidopsis*, Yamaguchi-Shinozaki et Shinozaki (1994) ont isolé un gène nommé rd29A qui est induit par la sécheresse, le froid ou un stress salin. Ce gène comporte au niveau de son promoteur un motif DRE qui intervient dans la réponse rapide au stress indépendamment de l'ABA, et un motif ABRE qui intervient dans une réponse plus tardive *via* l'ABA.

Enfin, les protéines impliquées dans l'activation des gènes (les facteurs de transcription) présentent elles aussi des variations d'expression en fonction du stress hydrique. Il a par exemple été isolé chez *Arabidopsis* un gène nommé Atmyb2, qui appartient à la famille des MYB, dont l'expression est induite par la sécheresse ou le stress salin (Urao et al., 1993). L'étude de ce facteur de transcription a permis de mettre en évidence que les motifs ABRE ou DRE n'étaient pas les seuls à réguler de manière spécifique l'expression des gènes lors d'un

déficit hydrique. *A contrario*, Li et Chen (2001) ont isolé chez le riz une nouvelle classe de facteurs de transcription (*OsZFP1*) dont la quantité du messenger diminue au cours du stress hydrique. Cette diminution peut être due à une inhibition de la transcription et/ou à une diminution de la stabilité des messagers. Ce résultat montre que l'adaptation au stress passe aussi par la répression spécifique de gènes, et notamment de certains facteurs de transcription.

### 3.3. Seconds messagers et molécules signal

Un des systèmes majeurs de l'intégration du signal chez les eucaryotes passe par la phosphorylation et la déphosphorylation de protéines *via* des protéines kinase et phosphatase.

Parmi ces protéines, nous trouvons les MAP (Mitogen-Activated Protein) kinases. Ces protéines sont des médiateurs de la transduction du signal provenant de la matrice extracellulaire, et sont présentes chez tous les eucaryotes. De nombreuses voies métaboliques faisant intervenir des MAP kinase pour différents types de stimuli (ex : toucher, sécheresse, froid, blessure) ont été décrites. Chez le tabac, Hoyos et Zhang, (2000) ont isolé deux MAP kinase induites par un stress osmotique. La première correspond à une protéine kinase induite par l'acide salicylique (SIPK) et la seconde seulement induite en milieu hyper-osmotique (HOSAK). Ces deux MAP kinase ne sont inductibles ni par l'ABA, ni par le  $Ca^{2+}$ , mais semblent être impliquées dans l'adaptation au stress hyper-osmotique. Cette MAP kinase présente une activité induite par la sécheresse, le stress salin ou un traitement à l'ABA. Ces résultats mettent en avant l'implication de cette MAP kinase dans la réponse aux stress ou à la déshydratation cellulaire.

Les protéines phosphatases tiennent une place tout aussi importante dans la transduction du signal. Ces protéines sont impliquées dans l'inactivation des MAP kinase par le biais de phosphorylations. Ces protéines agissent donc dans le sens opposé des MAP kinase, et permettent ainsi une régulation très fine de la transmission du signal dans la cellule. Meskiene et al. (1998) ont par exemple mis en évidence la régulation de l'activité d'une MAP kinase, répondant à différents types de stress (SAMK), par une protéine phosphatase 2C. Cependant ce contrôle n'est pas unilatéral, car les SAMK exercent un rétro-contrôle sur l'expression de cette protéine phosphatase. Ces résultats montrent la complexité des phénomènes de régulation qui interviennent dans la transduction du signal en réponse au stress hydrique.

Cependant, les signaux impliqués dans la transduction du signal suite à un stress hydrique font intervenir d'autres types de protéines dont l'activité est dépendante de l'état de phosphorylation. C'est le cas pour le produit du gène RAB17, inductible par l'ABA, qui existe sous différents états de phosphorylation. Au niveau sub-cellulaire, cette protéine a été localisée entre le cytoplasme et le noyau d'embryons de maïs. Des études biochimiques ont montré que cette protéine se liait à des peptides présentant un signal de localisation nucléaire, et que cette liaison était dépendante de l'état de phosphorylation. Il a donc été suggéré que la protéine RAB17 intervenait dans le transport de peptides vers le noyau au cours d'un stress hydrique (Goday et al., 1994).

Le calcium cytoplasmique agit en second messager dans de nombreux processus cellulaires, et pourrait être impliqué dans la réponse à un déficit hydrique. En effet, Hirayama et al., (1995) ont isolé un transcrite codant pour une phospholipase C spécifique du phosphatidylinositol, sur-exprimée au cours du stress hydrique. Cette enzyme catalyse la synthèse de l'inositol 1,4,5-triphosphate qui stimule le relargage du  $\text{Ca}^{2+}$  stocké dans le cytosol. De la même manière, il a été observé que la fermeture très rapide des stomates en réponse au stress semble induire une augmentation de la teneur en calcium libre dans le cytosol, accompagnée d'une variation de pH. Ces changements sont considérés comme les premiers événements liés à la diminution de la turgescence des stomates induite par l'ABA (Schroeder, 1995). Le calcium peut intervenir de différentes manières dans la transmission du message. Il peut tout d'abord être requis pour l'activation de protéines impliquées dans les cascades de transduction impliquant les MAP kinase et les protéines phosphatase, ou bien agir directement en faisant notamment varier le pH (Li et Komatsu, 2000).

Cependant, le calcium peut aussi intervenir dans la transmission du signal *via* les calmodulines. Les calmodulines correspondent à une famille multigénique de protéines de faible poids moléculaire. Une fois activées par le  $\text{Ca}^{2+}$ , les calmodulines vont à leur tour activer la transcription d'autres gènes. De par le grand nombre de gènes cibles de cette classe de protéine (McLaughlin et Wimmer, 1999) il semblerait que les calmodulines interviennent dans le contrôle d'une large gamme de réponses, liée aux stimuli environnementaux (Snedden et Fromm, 1998).

Le calcium ainsi que les dé/phosphorylation semblent intervenir de manière générale dans les mécanismes associés avec la perception du stress hydrique, et la transmission de l'information vers le noyau.

### 3.4. Contrôle post-transcriptionnel

Bien que de nombreuses études aient porté sur l'analyse des phénomènes de transcription, il existe d'autres mécanismes pouvant jouer sur la réponse au stress hydrique (Gallie, 1993). On pourra citer pour les messagers les mécanismes de maturation (« capping », épissage alternatif, polyadénylation), de stabilisation, de transport du noyau vers le cytoplasme, ainsi que l'efficacité de la traduction. Pour les protéines, le contrôle s'effectue au niveau de leurs modifications et au niveau de leur « turn-over ».

A titre d'exemple, chez la pomme de terre, un transcrite codant pour une invertase présente un épissage alternatif spécifique du stress froid, comparé à l'épissage en condition normale de culture (Bournay et al., 1996). Cet épissage élimine de la séquence neuf nucléotides qui codent normalement pour trois acides aminés impliqués dans une zone hautement conservée de la protéine. Ces auteurs n'ont cependant pas retrouvé ce mécanisme lors de blessures, ce qui implique que cette régulation post-transcriptionnelle est spécifique du stress hydrique.

Wolfraim et al. (1993) ont mis en évidence chez *Medicago falcata* l'importance de la stabilité des messagers dans la tolérance au froid. Ces auteurs ont isolé un gène (*cas18*) qui code pour une protéine de type LEA (déhydrine) accumulée en réponse à la sécheresse et à l'ABA. Ce transcrite est accumulé tout au long du stress, *via* une induction de la transcription et une diminution de la dégradation. Cependant, il est très rapidement dégradé lors de la phase de réhydratation. Les auteurs ont ajouté un inhibiteur de la transcription lors de la phase de réhydratation et ont observé une inhibition de la dégradation de ce messager. Ces résultats suggèrent qu'il existe une forme stabilisée de ce transcrite présente lors du stress hydrique. Une autre étude menée chez le maïs a permis d'isoler un transcrite (*pMAH9*) sur-exprimé au cours du stress hydrique, et codant pour une protéine qui a la particularité de se lier aux ARN (Ludevid et al., 1992). Ceci conforte l'hypothèse d'une stabilisation sélective des messagers.

Au niveau de l'efficacité de la traduction des messagers, Yamanaka et al. (1995) ont isolé des protéines (poly(T)-binding protein) qui se lient aux séquences poly (A) des messagers. Ces

protéines ont été isolées chez des plants de blé soumis à un stress froid. Ces auteurs ont montré, *in vitro*, que ces protéines avaient un impact dans l'augmentation de l'efficacité de la transcription des ARNm.

Une autre étape importante dans le contrôle de la régulation des gènes lors d'un stress hydrique concerne les modifications post-traductionnelles dont un des mécanismes clef est la phosphorylation. Nous avons vu précédemment que ce type de modification intervenait dans les cascades de transduction du signal. Ce type de modification peut aussi intervenir pour des protéines impliquées dans le métabolisme. Il a par exemple été montré pour des plantules de pois soumises à un stress hydrique, que des phosphorylations se produisaient au niveau du photosystème II, et qu'elles avaient un impact sur la photosynthèse (Giardy et al., 1996). D'autres types de modification sont aussi possibles. On pourra citer par exemple la glycosylation de différentes peroxydases de lin (*Linum usitatissimum*) au cours du stress (Fieldes et Gerhardt, 1998).

Différentes protéases induites par le stress peuvent être impliquées dans ces modifications post-traductionnelles (Schaffer et Fisher, 1988). Il a aussi été suggéré que certains inhibiteurs de protéase induits durant le stress avaient une action dans le contrôle de l'activité des protéases endogènes (Downing et al., 1992).

#### ***4. Plantes transgéniques et détermination de la fonction des gènes***

Les plantes transgéniques offrent la possibilité d'exprimer *in vivo* les gènes isolés lors d'un stress hydrique et ainsi de prouver leur implication dans ce phénomène. Ces transformations ont consisté à tester des gènes impliqués dans des voies particulières de la réponse au stress hydrique (ex : osmoprotection, LEA, régulation, stress oxydatif) et avaient pour but d'améliorer la tolérance au stress chez des plantes d'intérêt agronomique. D'un point de vue plus cognitif, il est possible d'étudier les voies métaboliques dans lesquelles sont impliquées les gènes isolés, et d'analyser l'impact de l'expression du gène introduit. Il est aussi possible de bloquer l'expression de certains gènes (co-suppression) et de clarifier leur rôle dans la réponse au stress hydrique.

L'accumulation d'osmolites constitue une adaptation fréquente à différents stress hydriques (sel, froid, sécheresse) chez de nombreux organismes. Parmi les transgènes fréquemment

utilisés, on pourra citer ceux qui sont impliqués dans le métabolisme des sucres. Il a par exemple été montré chez le tabac que des plants transgéniques exprimant un mannitol 1 phosphate déshydrogénase de bactérie, présentent une croissance accrue lors d'un stress salin (Tarczynski et al., 1993). Chez *Arabidopsis*, l'induction de ce gène provoque une augmentation de la germination en condition de déficit hydrique (Thomas et al., 1995).

On pourra aussi citer les travaux de Pilon-Smits et al. (1995) qui ont transformé des plants de tabac avec un gène bactérien codant pour l'accumulation de fructans. Les fructans sont des molécules composées de plusieurs fructoses, solubles et localisées dans la vacuole. Les plants ainsi transformés ont montré un fort accroissement de leur biomasse en condition de stress.

Au niveau des acides aminés, les gènes impliqués dans la synthèse de la glycine-bétaïne, de la proline et de l'arginine ont été utilisés dans des expériences de transformation génétique.

La choline deshydrogénase (impliquée dans la synthèse de la glycine- bétaïne) a par exemple été utilisée chez le tabac et a permis d'augmenter la tolérance à un stress salin et à un stress froid (Lilius et al., 1996 – Holmström et al., 2000). La choline oxydase (également impliquée dans la synthèse de la glycine- bétaïne) a largement été utilisée pour la production de plantes transgéniques tolérantes au stress hydrique. Chez *Arabidopsis*, il a été montré que ce transgène induisait une tolérance accrue au stress salin ainsi qu'une meilleure germination des graines lors d'un stress thermique (Hayashi et al., 1997 - Alia et al., 1998). Au niveau de la synthèse de la proline, on pourra citer les travaux portant sur la transformation d'*Arabidopsis* et du riz par la pyrroline carboxylate synthétase. L'expression de ce transgène induit une augmentation de la production de biomasse en condition de stress pour les deux espèces et, seulement chez *Arabidopsis*, une induction du développement floral (Kavi et al., 1995 - Zhu et al., 1998). Enfin, Capell et al., (1998) ont utilisé un gène codant pour une arginine décarboxylase pour transformer le riz, et ont observé que l'expression du transgène induisait une diminution des pertes en chlorophylle lors du stress hydrique.

D'autres gènes codants pour des enzymes impliqués dans l'osmorégulation ont aussi été utilisés tels que la myo-inositol-O-méthyle transférase (synthèse du D-ononitol) chez le tabac, ou une phosphoprotéine phosphatase chez *Arabidopsis*. Ces transformations ont confirmé l'implication de ces gènes dans la tolérance au stress hydrique (Sheveleva et al., 1997 - Espinosa-Ruiz et al., 1999).

Des gènes codants pour des LEA ont aussi été utilisés. On pourra citer par exemple la transformation du tabac par un gène codant une LEA de type 3, qui augmente la tolérance au stress hydrique (sécheresse et sel, Xu et al., 1996). Chez le riz, une LEA induite par le froid a aussi été utilisée, provoquant une amélioration de la tolérance au froid (Steponkus et al., 1998).

Les gènes impliqués dans la régulation de la transcription ont aussi été utilisés. Ces gènes présentent l'avantage d'agir en amont de la réponse au stress hydrique, et permettent donc d'obtenir des réponses plus précises. On pourra citer les travaux de Kasuga et al., (1999) qui, chez *Arabidopsis*, ont observé une augmentation de la tolérance au froid, à la sécheresse et au stress salin, après avoir transféré un facteur de transcription préalablement caractérisé comme inductible par différents types de stress. De la même manière, Winicov and Bastola, (1999) ont observé, chez la luzerne, une augmentation de la tolérance à un stress salin en utilisant le facteur de transcription Alfin1 comme transgène.

De nombreuses transformations ont également été effectuées en utilisant les gènes des enzymes impliquées dans l'élimination des espèces activées de l'oxygène (SOD à Cu/Zn, Mn, et Fe, glutathione S-transférase, ascorbates peroxidase). Ces transformations ont conduit à une amélioration de la croissance en condition de stress ainsi qu'à une meilleure tolérance au stress oxydatif induit par le déficit hydrique (McKaersie et al., 1993 - Roxas et al., 1997 - Wang et al., 1999).

Enfin des gènes codants pour des hormones de croissance ont été utilisés. En effet, Pustovoitova et al., (2000) ont introduit des gènes codants pour la synthèse de l'auxine chez le tabac (*N. silvestris*). Les auteurs ont observé une augmentation de la quantité d'auxine multipliée par sept, ainsi qu'une augmentation de la quantité d'ABA multipliée par quatre. Les plants transformés présentaient une augmentation du contenu relatif en eau, une meilleure capacité de rétention de l'eau ainsi qu'une meilleure tolérance au stress thermique. Au cours du stress, les plants transformés présentaient aussi une augmentation du contenu en acides aminés libres (ex : proline, tryptophane, etc.) accompagnée d'une amélioration de la tolérance. L'induction de la synthèse d'auxine montre donc que cette hormone joue un rôle dans les processus d'osmo-régulation. Ce résultat montre aussi que l'ABA n'est pas la seule hormone à intervenir dans la réponse et la tolérance au stress hydrique.



Bien que toutes ces transformations aient apporté des améliorations pour le caractère étudié, à savoir la tolérance à un déficit hydrique, il ne faut pas oublier que le transgène seul ne permet pas d'obtenir une expression spécifique (Bajaj et al., 1999). C'est pourquoi, des expériences de transformation ont été effectuées avec des séquences promotrices spécifiquement induites par le stress. On pourra citer notamment les motifs ABRE et DRE pour la réponse *via* l'ABA. De la même manière, il peut être intéressant de transférer le gène d'intérêt additionné à un peptide signal, ou directement dans des tissus ou organelles (chloroplaste) particuliers. Enfin les approches de transformation multigénique pourront apporter de nouvelles connaissances dans les phénomènes d'interaction entre les différentes voies qui mènent à la tolérance au stress hydrique, mais aussi apporter de nouveaux gains dans l'acquisition de cette tolérance.

### Conclusion

Les plantes soumises à stress hydrique montrent des changements radicaux au niveau de leur métabolisme, *via* des changements au niveau de la structure et de l'organisation cellulaire. La modification du métabolisme en réponse au stress est essentiellement due à une modification de la régulation des gènes. C'est pourquoi, les améliorations des techniques d'analyses différentielles ont été d'une importance capitale pour l'étude des phénomènes de réponse et d'adaptation des plantes au stress hydrique. Il est maintenant possible d'acquérir un très grand nombre de séquences correspondant à des transcrits dont l'expression varie au cours du stress (<http://www.stress-genomics.org/>). Il faut cependant noter que la majeure partie de ces transcrits reste de fonction inconnue.

Une grande partie du travail va maintenant consister à caractériser de manière plus fine les séquences qui présentent une variation d'expression. La technologie des réseaux à ADN pourra permettre de définir par simple hybridation dans quel ordre les gènes sont sur- ou sous-exprimés au cours du stress, mais aussi dans quel tissu, avec quel type de stress ou sous la dépendance de quel type d'hormone. Cependant, l'utilisation des mutants et des plantes transgéniques restera toujours un modèle de choix pour déterminer la fonction *in vivo* de chacun de ces gènes. Par contre, il apparaît difficile de caractériser par transgénèse l'ensemble des transcrits isolés par expression différentielle et/ou repérés par la technologie des réseaux à ADN.

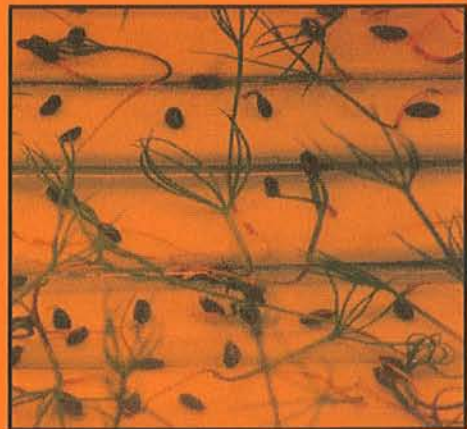
La tolérance au stress hydrique étant un phénomène complexe faisant intervenir de nombreux gènes, l'approche de génétique directe qui passe par la décomposition d'un caractère quantitatif en éléments plus simples à hérédité mendélienne (les QTL) peut fournir un très bon outil d'analyse, compte tenu de la disponibilité de carte génétique saturée chez de nombreux organismes.

L'analyse moléculaire de la réponse à la déshydratation est donc arrivée à un stade où de nombreuses séquences de gènes variant au cours du stress sont disponibles. Il est maintenant indispensable de combiner les approches physiologique, génétique, biochimique ainsi que les techniques de biologie moléculaire afin d'avoir une approche intégrée des phénomènes qui régissent la réponse au stress, et de pouvoir identifier les gènes les plus fortement impliqués dans la tolérance.

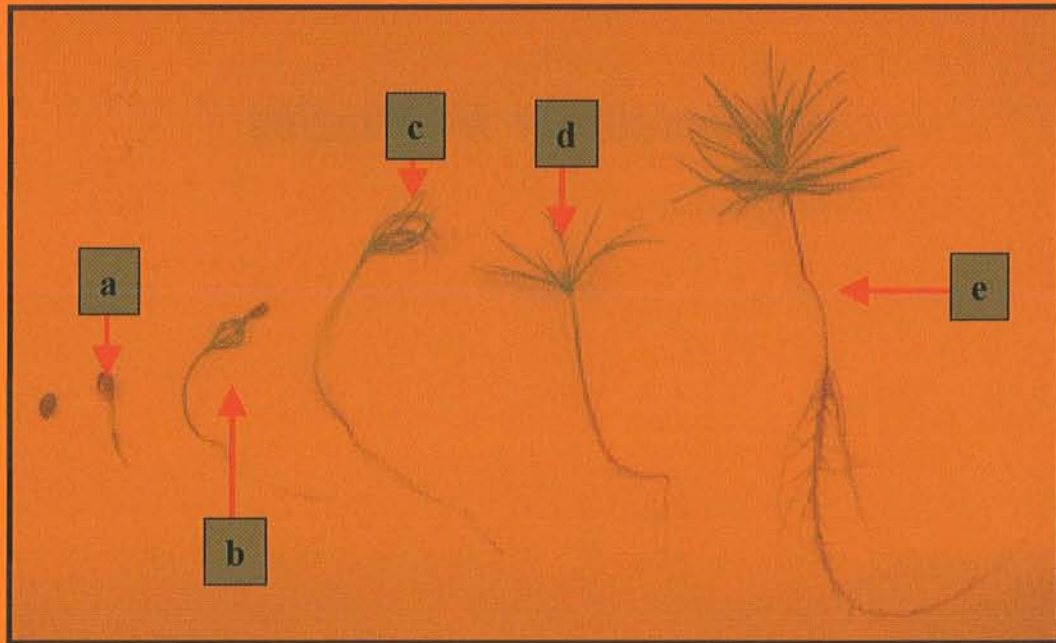
S.C.D. - U.H.P. NANCY 1  
BIBLIOTHÈQUE DES SCIENCES  
Rue du Jardin Botanique  
54600 VILLERS-LES-NANCY

## CHAPITRE 2

### Matériels et Méthodes

**A****B**

**Figure 25** : Germination des graines de pin maritime pour la mise en culture en milieu hydroponique. **A)** Premier jour de germination. **B)** Différents stades de développement après 15 jours de germination.



**Figure 26** : différents stades de germination de plantules de pin maritime. **a)** mégagamétophyte ; **b)** stade de repiquage des plantules en milieu hydroponique ; **c)** plantules après retrait des mégagamétophyte ; **d)** euphylls ; **e)** plantules après 15 jours dans le milieu de Seillac.

## 1. Matériel végétal et conditions expérimentales

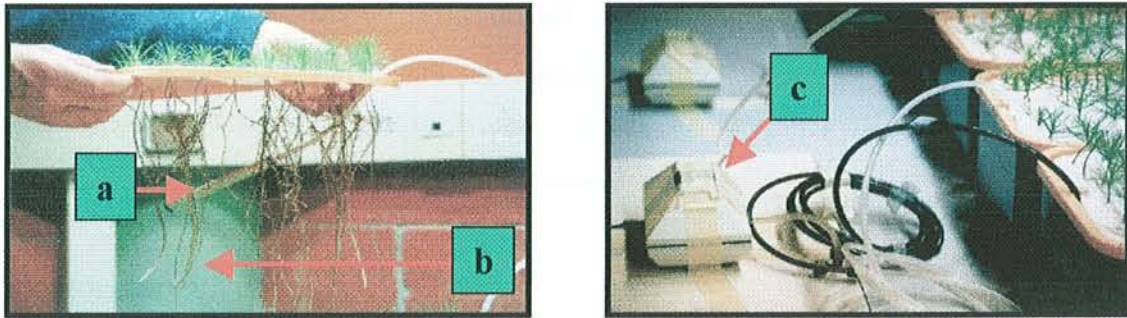
Le lot de graines de pin maritime (*Pinus pinaster* Ait.) utilisé dans le cadre de cette étude est issu d'une campagne de ramassage réalisée par le CEMAGREF (Centre de Machinisme Agricole et Génie Rural des Eaux et Forêts) dans des peuplements classés du Médoc. Les semences ont été placées à 4°C et à l'obscurité afin d'assurer une parfaite conservation, et pour faciliter la synchronisation de leur germination.

### 1.1. Germination des graines

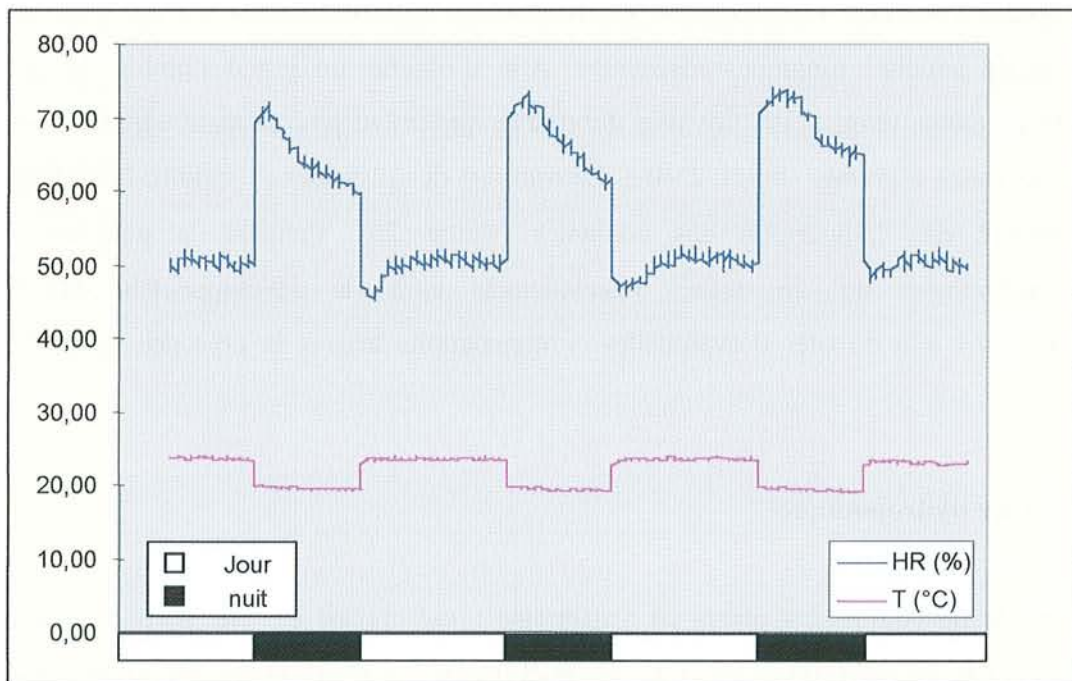
Lors de chaque expérience, les graines ont été stérilisées toute une nuit dans de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%, puis rincées trois fois avec de l'eau déminéralisée et enfin déposées sur du papier Wattman humide (3MM) dans des germoirs pendant une quinzaine de jours (figure 25.A.). Ces derniers ont été placés dans une chambre de culture à une température de 18°C, et en présence de trois antifongiques différents (Synthane à 3<sup>0</sup>/<sub>00</sub>, Baytan à 2<sup>0</sup>/<sub>00</sub> et Cryptonol à 1<sup>0</sup>/<sub>00</sub>) pour éviter la sélection de souches fongiques résistantes. Afin d'obtenir un grand nombre de plantules germant en même temps, cinq fois plus de graines que prévu pour chaque expérience ont été traitées et mises à germer (figure 25.B.). Le transfert des plantules en culture hydroponique a été effectué dès l'apparition des euphylls (figure 26). Pendant la germination, les mégagamétophytes ont été retirés manuellement après le développement des feuilles cotylédonaires afin d'éviter d'éventuelles contaminations liées à la présence de ce tissu de réserve.

### 1.2. Culture hydroponique

La méthode de culture des plants en hydroponie a été choisie car elle permet de contrôler précisément la nutrition minérale et le potentiel osmotique et d'obtenir des racines exemptes de toute mycorhisation. Les graines germées ont été acclimatées pendant trois semaines en culture hydroponique contenant la solution nutritive (Seillac, 1960) décrite ci-dessous.



**Figure 27** : Parties aériennes et racinaires de plantules de pin maritime âgées de 14 jours, avant l'application du stress. **a)** Bulleur ; **b)** Racines non mycorhysées **c)** pompe.



**Figure 28** : Paramétrage de la chambre de culture. Variation de l'humidité relative (HR) et de la température (T°C) au cours du temps et de l'éclairément.

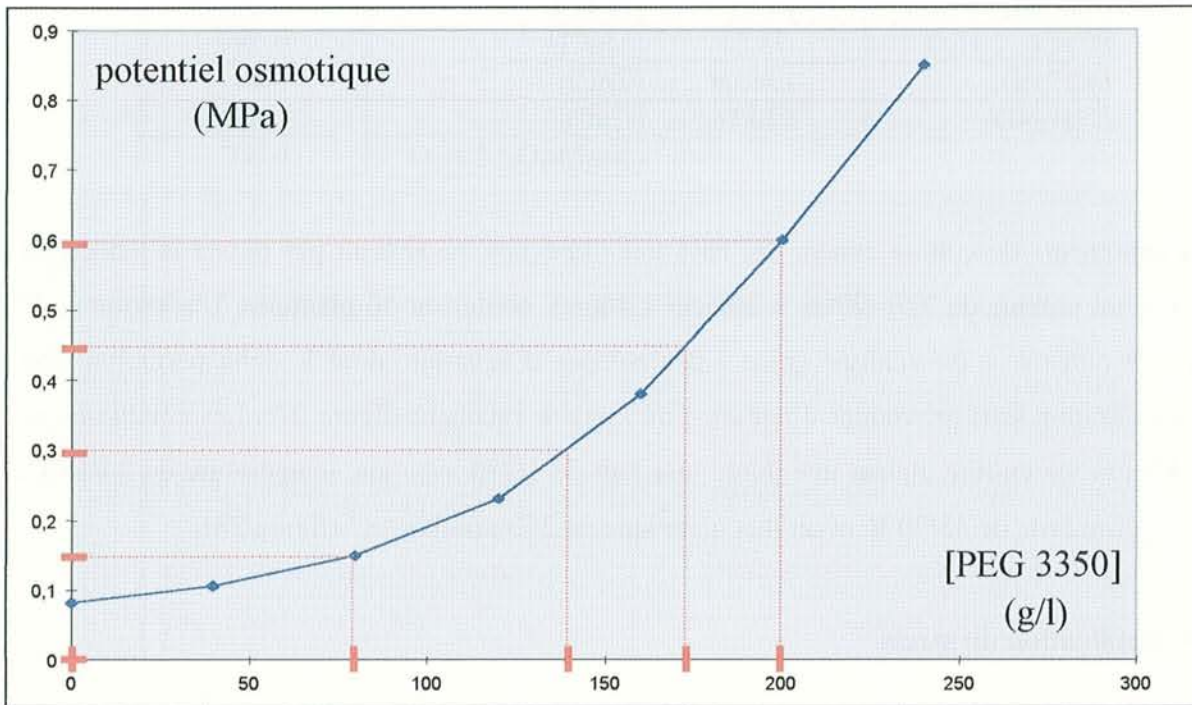
Macro-éléments (mg/l)		Micro-éléments (mg/l)	
MgSO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O	123,24	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1,03
CaCl <sub>2</sub> , 2 H <sub>2</sub> O	73,51	MnCl <sub>2</sub>	0,594
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	136,09	ZnCl <sub>2</sub>	0,041
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	320,16	CuCl <sub>2</sub>	0,051
		Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> , 2 H <sub>2</sub> O	0,007

Les conteneurs de culture étaient des bacs noirs opaques, ne laissant pas passer la lumière et avaient un volume de 7,5l (29cm x 20,5cm x 14cm), contenant 50 plantules. L'aération de la solution nutritive a été réalisée grâce à des pompes d'aquarium dont le débit permettait une bonne aération sans provoquer d'agitation du système racinaire (figure 27). Les conditions de la chambre de culture étaient une durée jour/nuit de 16/8h avec une température de 24/18°C, une hygrométrie de 45/70 % et un flux quantique de 260  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  (figure 28).

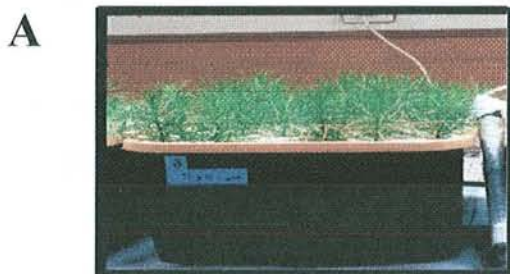
### 1.3. Application du stress

L'application du stress hydrique s'est faite par ajout d'un osmoticum à la solution nutritive. L'osmoticum utilisé est le polyéthylène glycol (PEG). Le PEG de masse moléculaire 3350 g/mol a été choisi car il présente le double avantage d'avoir un poids moléculaire suffisamment élevé pour limiter l'absorption racinaire, tout en préservant la fluidité de la solution nutritive facilitant ainsi sa manipulation. Enfin, la référence que nous avons choisie (Sigma, réf. P3640) ne nécessite pas de purification avant utilisation afin d'éliminer les atomes d'aluminium ou de magnésium qui, en forte concentration, présentent une toxicité, et donc un stress supplémentaire pour les plantules (Triboulot, 1996).

Les pressions osmotiques des solutions de Seillac additionnées de PEG à différentes concentrations ont été déterminées à l'aide d'un osmomètre (Vapro 5520, Wescor, Logan, USA). Une courbe-étalon (figure 29) a été obtenue afin de déterminer les concentrations de PEG en fonction des potentiels osmotiques choisis pour la conduite des expérimentations. Les valeurs de potentiel de base ainsi que les concentrations en PEG correspondantes sont récapitulées dans le tableau ci-dessous :



**Figure 29** : Courbe étalon. Variation du potentiel osmotique en fonction de la concentration en PEG 3350.



**Figure 30** : **A)** Plantules de pin maritime témoins en culture hydroponique ; **B)** Plantules de pin maritime témoins en milieu terre.



Traitement	PEG 3350 (g/l)	$\psi$ (MPa)
Témoins : m0	0	-0,08
Stress faible : m1	80	-0,15
Stress moyen 1 : m2	140	-0,30
Stress moyen 2 : m3	180	-0,45
Stress fort : m4	210	-0,60

#### 1.4. Contrôle des conditions de culture

Tout au long de l'expérience, les parties aériennes des plantules ont été traitées, tous les 15 jours, avec des antifongiques afin d'éviter d'éventuelles contaminations. De même, le milieu de culture a été changé chaque semaine pour éviter toute prolifération de microorganismes ainsi que d'éventuelles variations de pH ou de composition du milieu, liées notamment à l'absorption préférentielle de certains ions ou bien encore à l'évaporation de l'eau. Enfin, la température et l'hygrométrie de la salle de culture étaient contrôlées en permanence, pour éviter tout risque de stress associés (ex : stress thermique).

#### 1.5. Plan expérimental

Les plantules de pin maritime ont été soumises à 4 niveaux de stress en culture hydroponique auxquels s'ajoutaient 2 témoins : des témoins hydroponie, poussant dans le milieu de Seillac sans PEG et des témoins en terre arrosés à la capacité au champ une fois par semaine (figure 30).

Dans le tableau ci-dessous, nous récapitulons l'âge des plantules (en jours) en fonction de la durée du traitement (en jours) :

Prélèvement	Durée du stress	Age
t0	0	21
t1	1	22
t2	10	31
t3	21	42
t4	45	66

Au final, on obtient donc 30 types d'échantillons qui se répartissent selon un factoriel, où l'intensité du stress augmente à la fois en fonction du potentiel osmotique et de la durée du stress :

	-0,08 MPa	-0,15 MPa	-0,30 MPa	-0,45 MPa	-0,60 MPa	Terre
0 jour						
1 jour						
10 jours						
21 jours						
45 jours						

### 1.6. Stress rapide

Nous avons réalisé des expériences complémentaires, afin d'étudier la réponse précoce du pin maritime à un stress hydrique. Le matériel végétal a été traité de la même manière que précédemment. Seules deux conditions ont été utilisées : m0 et m3, la durée du traitement étant de 1h et de 5h.

## 2. Mesure des paramètres physiologiques et caractérisation du stress

### 2.1. Mesure du taux de chlorophylles

Le dosage des chlorophylles a été obtenu après broyage de 1,5g de matériel végétal dans 10ml d'acétone à 80%. Les extraits ont été centrifugés 10min à 3000g, puis dosés par spectrophotométrie. Nous avons mesuré les densités optiques à deux longueurs d'ondes différentes correspondant aux pics d'absorption de la chlorophylle a (663nm) et b (645nm), afin d'en déterminer les quantités correspondantes (mg/ml ; Arnon, 1949).

### 2.2. Mesure des acides gras

#### 2.2.1. Extraction des lipides membranaires

La technique utilisée est une adaptation du protocole de Folch, (1957) visant à améliorer le rendement et la qualité des extractions. Seules les parties aériennes ont été utilisées pour les analyses des lipides membranaires. Les échantillons ont été broyés dans de l'azote liquide. Le

broyage dans de l'azote liquide présentant le double avantage de faciliter le broyage et de limiter la  $\beta$ -oxydation des lipides. 3 ml de méthanol par gramme de matière fraîche sont ajoutés au broyat afin de rompre les liaisons lipoprotéiques. 6ml de chloroforme ont ensuite été ajoutée au mélange pour solubiliser les lipides (sous agitation, 2min). Afin d'obtenir une bonne séparation entre la phase aqueuse et la phase organique (lipidique) on a ajouté 4ml d'eau distillée. Après centrifugation à 4500rpm pendant 10 minutes, la phase organique a été récupérée. Enfin, après évaporation du solvant à sec sous azote, l'extrait sec est repris dans 2 ml de chloroforme.

### 2.2.2. Séparation des lipides membranaires

La technique que nous avons utilisée est la chromatographie sur couche mince (CCM). Le principe de base de la CCM consiste à séparer différents constituants d'un mélange (lipides polaires) en les soumettant à deux forces : la première provient de la phase stationnaire polaire (force de rétention) constituée d'un gel de silice coulé sur une plaque de verre, la seconde est liée à la phase mobile constituée d'un mélange de solvants se déplaçant par capillarité (force d'entraînement). L'interaction de ces deux forces étant différente pour chaque constituant du mélange, on obtient alors une migration différentielle des composés en fonction de leur polarité.

Les échantillons ont été déposés de manière automatique (Camag IV, Linomat) sur des plaques de gel de silice préalablement activées 1h à 100°C. Le solvant de migration (Heape, 1985) qui permet de séparer les différentes classes de lipides, comprend par ordre de polarité croissante : 6ml de chloroforme 8°, 10ml d'acétate de méthyle, 8,6ml propanol 1, 2,8ml de méthanol, et 2,5ml de KCL à 0,25%.

La révélation, à caractère non destructif, utilise la fixation réversible de vapeurs d'iode sur les doubles liaisons des lipides. Il est donc possible d'identifier les MGDG (monogalactosyl diglycérade), DGDG (digalactosyldiacylglycérade) et les phospholipides totaux, par comigration avec un mélange de témoins (Sigma).

### 2.2.3. Préparation des acides gras pour la chromatographie en phase gazeuse

Les trois classes de lipides ont alors été directement récupérées à partir des aires de silice correspondantes. Afin d'analyser les acides gras contenus dans chacune de ces 3 classes, la méthode utilisée est la chromatographie en phase gazeuse (CPG). Pour ce faire, les acides

**Tableau 3** : Récapitulatif du matériel et des conditions de chromatographie en phase vapeur.

Colonne utilisée	BPX 70 SGE
Phase fixe	Polaire (70% cyanopropyl sur squelette siloxane)
Diamètre interne	0,25 mm
Epaisseur du film	0,25 $\mu$ m
Gaz vecteur	Hélium
Pression	1,5bar
Température de l'injecteur	250°C
Température du four	De 140 à 240°C
Accroissement de température	3°C/minute
Température du détecteur	260°C
Intégrateur	Enica 21
Chromatographes	DI 700 Chrompack CP 9000

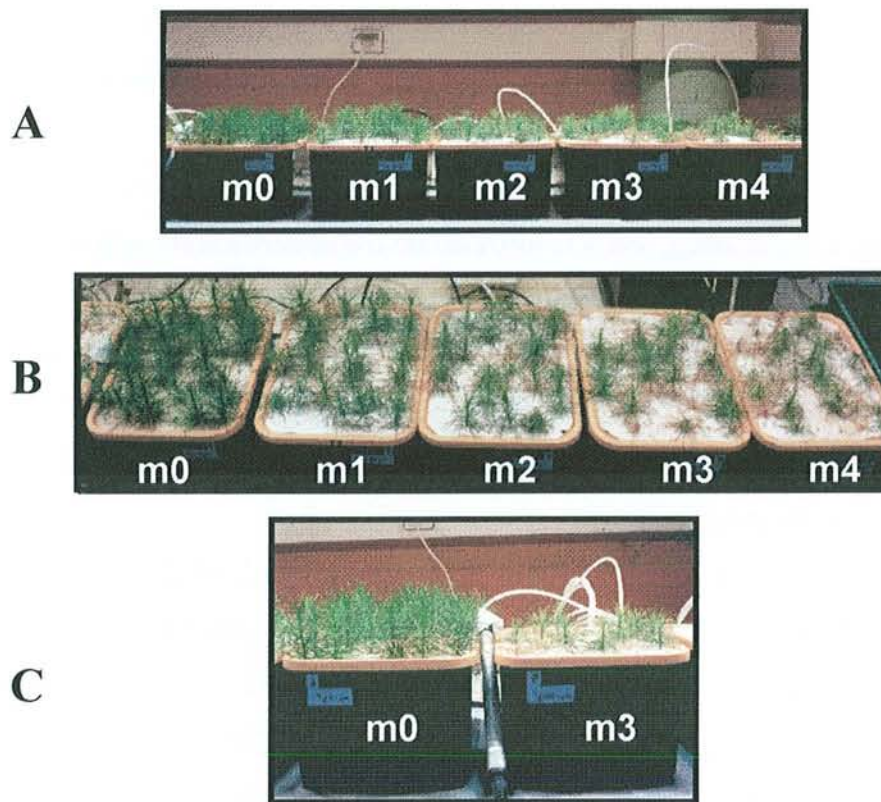
gras doivent être dans un premier temps séparés du glycérol qui les porte et dans un second temps, méthylés. En effet, sous cette forme, les acides gras sont volatilisables pour l'analyse par CPG.

Le préparation des acides gras pour la CPG est réalisée en une seule étape, directement à partir des prélèvements de silice, selon la méthode de transestérification décrite par Chapman (1987). La réaction consiste à mélanger la silice avec 1ml de méthanol (groupement méthyl), 1ml de trifluorure de bore (saponification des lipides) et 500µl de benzène (solubilisation de tous les constituants). A cela on ajoute 30µl d'acide heptadécanoïque (C17, 0,25 µg/µl) comme étalon interne pour la quantification. Le mélange est ensuite placé 1h à 80°C pour accélérer la transestérification.

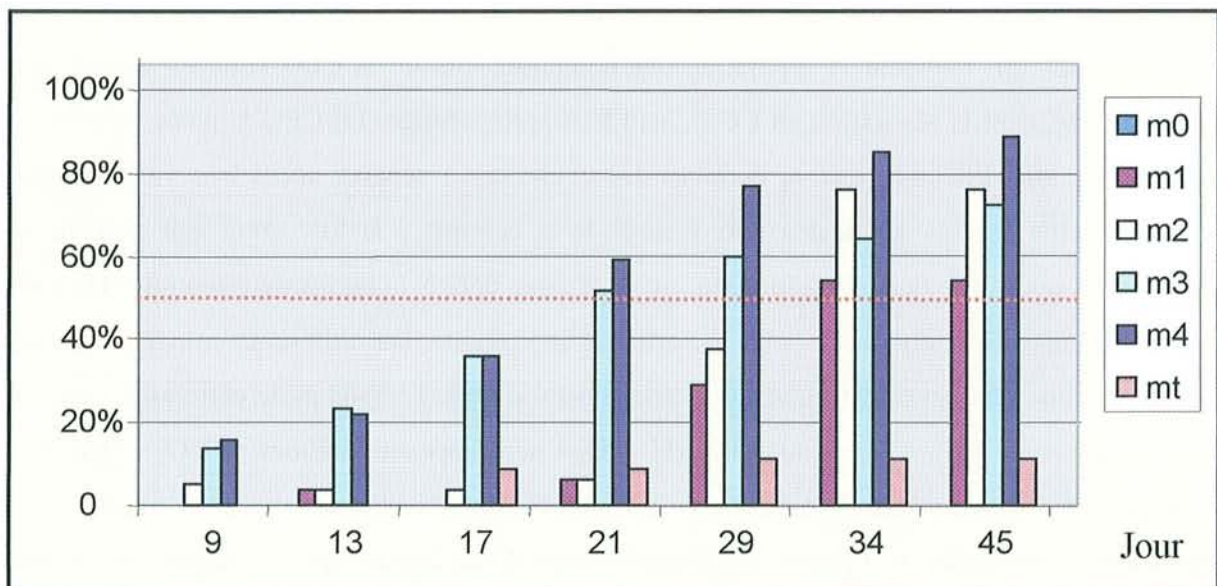
Après refroidissement, on ajoute au mélange 2,5ml d'hexane et 2 ml d'eau, suivi de 5min de centrifugation à 2500rpm à 4°C. Seule la phase organique contenant les esters d'acides gras est récupérée, puis filtrée sur sulfate de sodium anhydre afin de capter d'éventuelles traces d'eau. Une deuxième extraction de la phase aqueuse avec 1ml d'hexane est effectuée selon la même procédure. La nouvelle phase hexanique ainsi récupérée est ensuite ajoutée à la première. Enfin, la phase hexanique totale est évaporée à sec sous azote, et reprise dans 80 µl d'hexane pur. L'extrait contenant les acides gras est alors prêt pour l'analyse en CPG.

### 2.2.4. Chromatographie en phase gazeuse des acides gras

Les principes qui régissent la séparation des composés lors de la CPG sont les mêmes que ceux qui régissent la séparation en CCM, seul le support change. En CPG la phase mobile est un gaz vecteur (l'hélium) qui va entraîner les composés à séparer après leur volatilisation. Lors de cette analyse, les acides gras sortent de la colonne à la fois selon leur nombre de carbone et selon leur taux d'insaturation, on peut donc définir le temps de rétention (Tr) ainsi que le volume de rétention (Vr). A la sortie de la colonne, ces différents constituants sont brûlés par une flamme d'hydrogène, et partiellement ionisés. L'étendue de cette ionisation est déterminée par la nature des composants ( $H_2 + O_2 + \text{substances organiques} \rightarrow CO_2 + H_2O + 2 \text{ ions positifs} + 1 \text{ ion négatif} + 1 \text{ électron}$ ). L'ensemble des charges négatives est capté par un détecteur à ionisation de flamme (FID) par le biais d'une anode, qui va induire un courant dont l'intensité est proportionnelle à la quantité d'effluent. Le récapitulatif du matériel et des conditions de chromatographie est répertorié dans le tableau 3.



**Figure 31 :** **A) et B)** Plantules âgées de 42 jours, après 21 jours de traitement pour les milieux m0 (-0,08MPa), m1 (-0,15MPa), m2 (-0,30MPa), m3 (-0,45MPa) et m4 (-0,60MPa). **C)** Plantules âgées de 42 jours, après 21 jours de traitement pour les milieux m0 (-0,08MPa) et m3 (-0,45MPa).



**Figure 32 :** Variation de taux de mortalité des plantules de pin maritime, au cours du temps et en fonction du milieu.

### 2.2.5. Analyse qualitative et quantitative des acides gras

Lors de l'étude qualitative des acides gras, on doit tenir compte, pour un système de chromatographe donné, que chaque substance est caractérisée par son temps de rétention (Tr). C'est pourquoi, l'injection préalable d'un mélange témoin d'acide gras nous permet une identification des différents constituants analysés, par comparaison des Tr.

Au niveau de l'analyse quantitative, on se base sur la proportionnalité existant entre la surface d'un pic et la quantité du composé analysé. Une quantité d'étalon interne connue peut être directement reliée à sa surface sur le chromatogramme. Une comparaison de la surface du pic de C17 avec celle de chaque autre pic du même chromatogramme permet la détermination quantitative de tous les acides gras contenus dans le mélange en  $\mu\text{g}$  d'acides gras par g de matériel végétal de départ.

## 3. Analyse du transcriptome et caractérisation des EST

Dans tous les cas où nous avons utilisé des kits, les protocoles fournis par les fabricants ont été utilisés et n'ont pas été détaillés dans ce rapport. On trouvera dans le texte le nom du kit utilisé ainsi que celui du fabricant.

### 3.1. Extraction des ARN

Pour extraire les ARN totaux, nous avons adapté le protocole de Chang et al (1993). En effet, les rendements étant extrêmement faibles, nous avons dû doubler la quantité de tampon d'extraction par gramme de végétal, soit 15ml pour 1g. Les extraits ont ensuite été analysés par spectrophotométrie. La qualité des ARN obtenus a été déterminée par la valeur du rapport de  $D.O_{260}/D.O_{280}$  qui était comprise entre 1,8 et 2. Le rendement moyen était de  $20\mu\text{g}$  d'ARN totaux par gramme de matériel végétal frais.

### 3.2. ADNc-AFLP

Les échantillons utilisés lors de l'ADNc-AFLP correspondent à un mélange de 80 individus issus des traitements m0 (-0,08MPa) et m3 (-0,45MPa) au temps t3 (21 jours de stress, figure 31). Nous avons choisi m3 car cela correspondait à un niveau de stress où le taux de survie était proche de 50% (figure 32), et t3 car cela correspondait à un stress de durée moyenne. Les

parties aériennes (aiguilles et tiges mélangées) et les racines ont été analysées séparément. Toutes les réactions PCR ont été effectuées dans le thermocycleur Perkin Elmer 9700.

### 3.2.1. Synthèse et vérification des ADNc

100µg d'ARN totaux ont été digérés pendant 1h à 37°C en présence de 50U de DNase RNase Free RQ1 (Promega) et d'inhibiteur de RNase (RNasin, Promega) afin d'éliminer les contaminations dues à l'ADN génomique, puis purifiés avec le kit RNeasy de chez Qiagen afin d'éliminer toute trace de protéine ou d'ADN génomique dégradé. Enfin, les ARN messagers ont été isolés à l'aide de résines contenant des poly(T) (kit Oligotex, Qiagen). Les ARNm ont été rétro-transcrits en ADN complémentaire double brin à bords francs à l'aide du « cDNA synthesis kit » (Promega).

Après extraction au chloroforme-alcool isoamilique (24 : 1) et précipitation à l'éthanol, les ADNc ont été repris dans un volume final de 40µl d'eau stérile.

La qualité des ADNc synthétisé a été analysée par PCR dirigée, en utilisant des amorces correspondant à un gène fortement (CAD: cinamyl alcool deshydrogénase, EC 1.11.1.7.) et faiblement (Myb : facteur de transcription) exprimé.

Les PCR ont été effectuées dans un volume réactionnel de 25µl de tampon 1X (Gibco BRL) contenant 0,1mM de dNTP, 0,2µM de chacune des amorces, 2mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,5U de *Taq* DNA Polymerase (Gibco BRL) et 1µl (2ng) d'ADNc. Les réactions PCR ont été effectuées selon les paramètres suivants : dénaturation (4min, 94°C), puis 35 cycles de dénaturation (30s, 94°C), hybridation (30s, 55°C ou 58°C, respectivement) et extension (1min, 72°C), puis une extension finale de 10min à 72°C.

### 3.2.2. ADNc-AFLP non radioactive

Les étapes de digestion et de ligation ont été effectuées simultanément pendant 3h à 37°C dans un volume total de 15µl contenant 10µl d'ADNc (50ng), 1,5U de chacune des deux enzymes de restriction *Pst*I et *Mse*I (Pharmacia), 0,5U de *T4* DNA ligase (Pharmacia), 0,15mM de dATP, 1pmol d'adaptateur *Pst*I, 10 pmol d'adaptateur *Mse*I dans du tampon 1X One Phor All (OPA, Pharmacia). Les ADNc ainsi digérés et liés ont été dilués dix fois et utilisés comme matrice pour la première amplification (préamplification ou PCR1). La préamplification a été effectuée dans un volume de 25µl de tampon 1X contenant 0,2mM de chaque dNTP, 0,25µM de chacune des amorces non sélectives (voir ci-dessous), 1,2mM de



MgCl<sub>2</sub>, 0,4U de *Taq* DNA Polymerase (Gibco BRL) et 10µl d'ADNc dilué. La réaction PCR a été effectuée selon la procédure suivante : dénaturation (4min, 94°C), puis 28 cycles de dénaturation (30s, 94°C), hybridation (30s, 60°C) et extension (1min, 72°C). 5µl de produit de préamplification ont été analysés sur gel d'agarose 1% contenant du BET, révélant un « smear » autour de 500pb. Le produit de la réamplification a ensuite été dilué 35 fois avant d'être utilisé pour l'amplification sélective (PCR2). Les amorces utilisées pour la PCR2 sont complémentaires des adaptateurs *Pst*I et *Mse*I, avec une ou deux bases sélectives en 3'-terminale. Les séquences des adaptateurs ainsi que celles des amorces sont répertoriées ci-dessous :

### Séquences des adaptateurs

5'-GACGATGAGTCCTGAG-3' : Adaptateur 1 *Mse*I

5'-TACTCAGGACTCAT-3' : Adaptateur 2 *Mse*I

5'-CTCGTAGACTGCGTACATGCA-3' : Adaptateur 1 *Pst*I

5'-TGTACGCAGTCTAC-3' : Adaptateur 2 *Pst*I

### Amorces

5'-GATGAGTCCTGAGTAA-3' : amorce *Mse*I non sélective

5'-GATGAGTCCTGAGTAA $\mathbf{X}$ -3' : amorces *Mse*I sélectives

$\mathbf{X}$  : A, C, G, AC, AT, CC, GA and GT

5'-GACTGCGTACATGCAG-3' : amorce *Pst*I non sélective

5'-GACTGCGTACATGCAG $\mathbf{X}$ -3' : amorces *Pst*I sélectives

$\mathbf{X}$  : G, AG, AT, CA, CC, CG, CT, GA, GT and TG.

La PCR2 a été effectuée dans un volume de 10µl de tampon 1X (Gibco BRL) contenant 0,1mM de chaque dNTP, 0,15µM de l'amorce *Pst*I et 0,30µM de l'amorce *Mse*I, 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,5U de *Taq* DNA Polymerase (Gibco BRL) et 2,5µl d'ADNc dilué issu de la PCR1. Les paramètres de la PCR2 étaient les suivants : dénaturation (4min, 94°C), puis 1 cycle de dénaturation : 30s à 94°C, d'hybridation : 30s à 65°C et d'élongation : 1min à 72°C, puis 13 cycles avec une température d'hybridation qui diminue de 0,7°C par cycle (« touch-down »), suivis par 23 cycles de dénaturation : 30s à 94°C, d'hybridation : 30s à 56°C et d'élongation : 1min à 72°C. Les produits de cette PCR2 ont été séparés par électrophorèse sur gel de séquence, contenant 4% d'acrylamide/bisacrylamide (19/1). Après préchauffage des gels (1h, 80 W), les produits PCR ont été séparés au cours d'une migration de 2,5 heures à 80 Watts.

### 3.2.3. ADNc-AFLP radioactive

Les mêmes paramètres que pour l'ADNc-AFLP non radioactive ont été utilisés, à l'exception près que le coté 5'-terminal des amorces était marqué avec l'isotope 33 du phosphore. Cette étape de marquage a été effectuée dans un volume réactionnel de 25µl, contenant du tampon 1X OPA, 50µCi de  $\gamma$ -[<sup>33</sup>P] dATP, 6µM de l'amorce *Pst*I, 5U de T4 Kinase (Pharmacia), suivie d'une incubation d'une heure à 37°C. La réaction a ensuite été stoppée par une incubation de 10min à 80°C.

### 3.2.4. Révélation et isolation des fragments différentiels

Les gels ont été colorés au nitrate d'argent selon le protocole décrit par Bassam et al. (1991) que nous avons légèrement modifié. Le protocole modifié est le suivant : 30min de fixation dans de l'acide acétique 10%, 3min de lavage dans de l'eau distillée (4 fois), 30min de coloration dans une solution à 0,1% de nitrate d'argent et 0,05% de formaldéhyde, puis lavé 10s dans de l'eau distillée. La révélation des fragments a eu lieu dans une solution à 4°C contenant du carbonate de sodium (30g/l), du formaldéhyde (0,05%) et du thiosulfate de sodium (2mg/l). La coloration est ensuite stoppée par immersion du gel dans de l'acide acétique 10% pendant 15min. Ensuite les gels sont à nouveau rincés dans de l'eau distillée pendant 30min puis séchés à température ambiante pendant 16 heures. Les fragments différentiels (TDF : Transcript Derived Fragment) ont ensuite été réhydratés avec 5µl d'eau stérile pendant 30min et élués à nouveau avec 5µl d'eau stérile. Les éluats ont ensuite été directement utilisés comme matrices pour les PCR de réamplification en utilisant les mêmes conditions que pour la PCR2. Les produits PCR ont ensuite été séparés sur gel d'agarose 1,5% et purifiés avec le « PCR product purification kit » (Promega). Enfin, la qualité et la spécificité des TDF purifiés ont été analysées par comigration sur gel de séquence avec la PCR2 correspondante, dans les mêmes conditions que décrit précédemment.

### 3.2.5. Clonage et séquençage des TDF

Chaque fragment a été soumis à une élongation de 30min à 72°C afin d'ajouter une adénine à leur extrémité. Puis, le clonage des fragments a été effectué à l'aide du « TOPO TA-cloning kit » (Invitrogene) dans un vecteur plasmidique contenant les amorces universelles M13F (5' TGACCGGCAGCAAAATG 3') et M13R (5' GGAAACAGCTATGACCATG 3'). Les

plasmides contenant les TDF ont ensuite été utilisés pour transformer des bactéries compétentes vendues avec le kit. Après culture des bactéries, les plasmides ont été extraits selon la méthode mise au point par Sambrook *et al.*, (1989). Les plasmides ont ensuite été digérés avec l'enzyme de restriction *EcoR*I dans un volume réactionnel de 10 µl contenant 1X de tampon OPA, 1,5U d'*EcoR*I, 0,8µg de RNase A et 2µl de plasmide. La taille des inserts ainsi obtenus a été vérifiée sur gel d'agarose 1,5% coloré au BET. Le séquençage de ces TDF, à partir des vecteurs correspondants, a été effectué sur un séquenceur Li-Cor 4000. La réaction de séquence a été obtenue en utilisant le « DNA sequencing kit » (PE applied biosystems, Perkin-Elmer) avec l'amorce M13F marquée à l'IRD 800 (MWG Biotech).

### 3.3. Analyse d'expression

#### 3.3.1. Northern

Des aliquots de 10µg d'ARN totaux extraits à partir de tiges, d'aiguilles et de racines ont été dénaturés et séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1% contenant du formaldéhyde (1X) et du BET, comme décrit par Sambrook *et al.*, (1989). La quantité d'ARN totaux déposée pour chacun des échantillons a été vérifiée par visualisation des ARN ribosomaux sous lampe U.V. Après migration, les gels ont été traités quelques secondes dans du 10X SSC. Le transfert des ARN sur membrane de nylon (GeneScreen Plus® nylon membrane, NEN Life Sciences Products Inc) a été effectué par capillarité. Les sondes utilisées correspondant aux TDF ont été générées par amplification PCR à partir des plasmides. Les PCR d'amplification des inserts ont été effectuées dans un volume réactionnel de 30µl dans un tampon 1X (Gibco BRL) contenant, 0,1mM de dNTP, 0,2µM de chaque amorce (M13F et M13R), 2mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,5U de *Taq* DNA Polymerase (Gibco BRL) et 2µl de plasmide dilué 80 fois. Les conditions PCR utilisées sont les suivantes : dénaturation 5min à 94°C, suivie par 28 cycles de dénaturation à 94°C pendant 45s, d'hybridation à 55°C pendant 45s et d'élongation à 72°C pendant 45s, et une extension finale de 10min à 72°C. La taille des fragments PCR ainsi obtenus a été vérifiée sur gel d'agarose comme décrit dans le paragraphe 3.2.5. Les fragments ainsi amplifiés ont ensuite été purifiés sur des colonnes S300-HR (Amersham-Pharmacia Biotech). Les inserts correspondant aux TDF ont ensuite été marqués au  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]dATP à l'aide du « Prime-it® II Random Primer Labeling kit » (Stratagene). Les sondes ainsi obtenues ont été purifiées sur les colonnes S300-HR. L'hybridation et le rinçage des membranes ont été

**Tableau 4** : Récapitulatif des amorces utilisées pour les RT-PCR ainsi que pour la recherche des séquences en 3'- et 5'-terminal.

Clone	Taille (pb)	Amorce U	Amorce L	Ta (°C)
Pp.rp4	101	GATGCGGAAGCTCTGTTTCA	GCCACCCTGATTTCCAGTG	60
Pp.rp33	146	CGATGGCGGTGACAC	CCCCAGTAGTAGTCTCCTCA	55
Pp.rp9	117	AGCAGGGGTGAGAAATGTTC	TCGGCCTCAGTTTGAATGTA	52
Pp.rp19	224	AAAATGACCGGTGCTGTTTC	CGGGCGTCTTTCTCCTTCT	55
Pp.rp18	154	CGGCCTCATAGACATTGT	TTCGCTAGCAGAAGATTTAT	54
Pp.rp20	243	TGCCAATTATAGCTGATACA	TTAGCATGGAGGAGTCATAC	52
Pp.rp23	146	AGCCGCTGGTGTGACTGTT	TTGCTGCCACTTTCCAATCA	55
Pp.rp6	155	CATCGCCACCATCTCT	AGACGCAGTAACAACAGAAC	52
Pp.rp11	243	AAATGCCCAGCGAAGGTCT	AGCAATGGCGGAAGAGTCTC	52
Pp.rp2	300	GCCGAGCAGATTGCCTTTC	GCAGCCCTCCAAGACAGATT	60
Pp.rp3	264	AAATGCCCAATTCCTCTAAA	GGAGCGAACATGATTATGAA	54
Pp.ap1	184	GCGGAGGCGTGCGAGGTAGA	CCGCGCCGAAGGGGATTACT	62
Pp.ap2	159	GTAACCAACGGGTCTGTCAG	GTGTGCGTGGGCTTAGG	55
Pp.ap3	340	CTCAACTTCTCCCCATCCAT	TACCATTTCAGGCTCTCCG	55
Pp.ap11	370	TCAACTTCACCCCTGCTAAC	CTATGTTTTATGGAACGGGC	55
Pp.ap12	393	ATTAGCAGGGCATCTGTCTG	CACGCCTCTCATTTTCATC	55
Pp.ap14	141	GGTGGGTCGATGAAAGTC	GAACGGTGTTTACTGTTATT	54
Pp.ap21	282	TGCCTTTCACATCAAATAAT	TGTTCTCGCAATGGTATG	52
Pp.ap23	256	CTGGGATGAGATTGAAGA	GTGACTTGGACGAAAATAAT	52
Pp.ap25	255	TTGCAGCGGCCTTCAGAATC	CGTGGTGGTGGCAGACTTCC	60
Pp.ap36	260	GCTTCCAGCGCTTTCATCTG	TGGCCACGTAGGTGTCCTG	55
Pp.ap46	381	TACCCACGTACCTATGATTT	CACCTTCCCCTTTCAG	52
Pp.ap54	209	ACCATGCGGATTTCAATATC	GCGATGCTGCTTGTCTGTA	55
Ubiquitine	476	CAGCAAGCGCATTCAA	ATTCTTCCCTGGCTTTCATA	52 to 60

effectués comme décrit par Sambrook et al. (1989). Les membranes ont ensuite été mises à exposer avec des films d'autoradiographie (Konica medical) à  $-80^{\circ}\text{C}$  jusqu'à révélation.

### 3.3.2. RT-PCR (Rétro-transcription PCR)

Pour cette analyse, les ARN totaux ont été extraits séparément pour les racines et les parties aériennes (tiges et aiguilles), de chacune des conditions du factoriel, ainsi que dans les contrôles en terre. Chaque extrait d'ARN total a été digéré séparément pendant 1h à  $37^{\circ}\text{C}$  avec la DNase RNase free RQ1 (Promega) en présence d'inhibiteur de RNase (RNasin, Promega) puis purifié sur RNeasy column (Qiagen). Le mélange réactionnel utilisé pour un volume final de  $100\mu\text{l}$  de tampon 1X (Gibco BRL) est le suivant : 8U de DNase RNase free RQ1, 80U d'inhibiteur de RNase et  $50\mu\text{l}$  d'ARN total ( $20\mu\text{g}$ ). Des aliquots de  $2\mu\text{g}$  d'ARN totaux digérés ont été rétro-transcrits (Superscript II, Gibco BRL) à partir d'amorces oligo(dT) ancrées (possédant à leur extrémité 3'-terminale soit un A, soit un C ou soit un G en concentration égale) en ADNc simple brin. Les ADNc simple brin ainsi obtenus ont ensuite été dilués 4 fois. Les PCR ont été effectuées dans un volume réactionnel de  $50\mu\text{l}$  dans un tampon 1X (Gibco BRL) contenant,  $0,1\text{mM}$  de dNTP,  $0,2\mu\text{M}$  de chaque amorce (témoin : ubiquitine, et échantillons : TDF),  $2\text{mM}$  de  $\text{MgCl}_2$ ,  $0,5\text{U}$  de *Taq* DNA Polymerase (Gibco BRL) et  $2\mu\text{l}$  d'ADN double brin. Les amorces utilisées lors des réactions de RT-PCR sont répertoriées dans le tableau 4. Les paramètres d'amplification utilisés sont les suivants: dénaturation préliminaire 4min à  $94^{\circ}\text{C}$ , puis dénaturation 45s à  $94^{\circ}\text{C}$ , hybridation 45s comprise entre  $52^{\circ}\text{C}$  et  $62^{\circ}\text{C}$  selon les TDF, extension 1min à  $72^{\circ}\text{C}$ , et enfin une extension finale de 4min à  $72^{\circ}\text{C}$ .  $10\mu\text{l}$  de produit PCR ont été prélevés à 15 et 20 cycles puis stockés à  $-20^{\circ}\text{C}$  jusqu'à utilisation. Le produit final de la PCR (35 cycles) a été analysé sur un gel d'agarose 2% comme décrit précédemment. Pour chaque TDF analysé, la taille du produit PCR a été comparée à la taille attendue par analyse de séquence. Dans chacun des cas où on avait correspondance entre la taille attendue et la taille obtenue, les produits PCR correspondant à 15 et 20 cycles ont été séparés par électrophorèse sur un gel d'agarose à 1,2%. La synthèse des sondes spécifiques de chacun des TDF, l'hybridation et lavage des membranes de nylon ainsi que les révélations des autoradiographies, ont été réalisés comme décrit pour les expériences de northern. L'intensité de chacun des échantillons a été comparée à l'intensité des bandes correspondant à l'ubiquitine, grâce à une deuxième hybridation de la même membrane.

### 3.3.3. Recherche des séquences en 3'- et 5'-terminale des TDF

Disposant au laboratoire d'une banque orientée d'ADNc (Uni-Zap<sup>®</sup> XR vector, Statagene) qui fait l'objet d'un séquençage systématique, nous avons tout d'abord procédé à des comparaisons de séquences (BlastN) entre les TDF obtenus par ADNc-AFLP et les séquences disponibles sur la base de données pin maritime. La méthodologie d'analyse pour les comparaisons de séquence est détaillée dans le paragraphe 3.5.

#### 3.3.3.1. Recherche des séquences en 3'-terminale des TDF

Pour l'obtention des extrémités des 3'-terminales nous avons utilisé le kit « 3' RACE system for rapid amplification of cDNA ends kit » (Life technologies-Gibco BRL). 4µg d'ARN totaux correspondant aux aiguilles et aux racines des deux conditions (témoins et stressés) ont été utilisés pour l'obtention des ADNc. Les ADNc ainsi synthétisés présentent sur leur extrémité poly(T) une courte séquence nucléotidique (AUAP : 5' GGCCACGCGTCGACTAGTACTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT 3') qui servira de point d'ancrage à l'une des deux amorces pour l'amplification PCR sélective. Les PCR ont été effectuées dans un volume réactionnel de 50µl dans un tampon 1X (Gibco BRL) contenant, 0,3mM de dNTP, 0,2µM de chaque amorce, 2mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,5U de *Taq* DNA Polymerase (Gibco BRL) et 1µl d'ADNc. Les amorces utilisées correspondent en 3'-terminal à l'amorce AUAP et en 5'-codant à une amorce déterminée à partir des séquences des TDF. Les amorces utilisées lors des réactions de 3'-RACE sont répertoriées dans le tableau 4. Les paramètres d'amplification utilisés sont les suivants: dénaturation préliminaire 3min à 94°C, puis dénaturation 60s à 94°C, hybridation 60s comprise entre 52°C et 62°C selon les TDF, extension 90s à 72°C, et enfin une extension finale de 10min à 72°C. Les fragments ont ensuite été séparés, vérifiés sur gel d'agarose (2%), clonés et séquencés comme décrit dans le paragraphe 3.2.5.

#### 3.3.3.2. Recherche par PCR des séquences en 5'-terminale des TDF

Les séquences localisées en 5'-terminale ont été obtenues à partir d'une banque orientée d'ADNc (Uni-Zap<sup>®</sup> XR vector, Statagene). Le vecteur utilisé pour la construction de cette banque possède de part et d'autre de son site de clonage les amorces universelles T3 et T7. La banque étant orientée, les ADNc ont été clonés avec la queue poly(T) du côté de l'amorce T7. C'est pourquoi, les réactions d'amplification PCR ont été réalisées à l'aide de l'amorce T3

(3'-AATTAACCCTCACTAAAGGG-5') en 5'-terminal et une amorce correspondant au TDF en 3'codant. Les amorces utilisées lors des réactions d'amplification PCR sont répertoriées dans le tableau 4. Le mélange réactionnel utilisé est le même que celui décrit pour l'amplification des sondes dans le paragraphe 3.3.1, à l'exception près que la matrice utilisée correspondait à un aliquot de la banque sous forme de phage (5µl). Les paramètres d'amplification utilisés sont les suivants: dénaturation préliminaire 4min à 94°C, puis dénaturation 60s à 94°C, hybridation 60s comprise entre 52°C et 62°C selon les TDF, extension 90s à 72°C, et enfin une extension finale de 10min à 72°C. Les fragments ont ensuite été séparés, vérifiés sur gel d'agarose (2%), clonés et séquencés comme décrit précédemment.

### 3.4. Hybridation Suppressive et Soustractive (SSH)

Nous avons extrait les ARNm comme décrit dans le paragraphe 3.1. Le kit « SMART<sup>TM</sup>PCR cDNA Synthesis Kit » (Clontech) a été utilisé pour la synthèse des ADNc double brin, à partir de 1µg d'ARN totaux. Les hybridations de suppression et de soustraction ont été réalisées avec le kit « PCR-Select<sup>TM</sup> cDNA Subtraction Kit » (Clontech). Enfin, en vue d'optimiser le système, toutes les réactions PCR ont été faites avec les réactifs fournis dans le kit « Advantage<sup>®</sup> cDNA PCR Kit » (Clontech). Les ADNc différentiels que nous avons obtenus ont été clonés et séquencés comme décrit dans le paragraphe 3.2.5.

### 3.5. Analyse des séquences

#### 3.5.1. Préparation à l'analyse des séquences

Une fois les séquences obtenues, un travail d'analyse et de vérification des séquences est alors nécessaire avant toute interrogation sur des bases de données.

Tout d'abord les ambiguïtés de lecture sont corrigées. Une deuxième étape consiste à rechercher les amorces qui ont servi à l'amplification des fragments, particulièrement pour les TDF qui proviennent de l'ADNc-AFLP. Enfin, les séquences provenant du vecteur de clonage doivent être éliminées. Une fois ces étapes réalisées, les séquences sont prêtes pour une caractérisation bio-informatique et pour leur soumission dans les bases de données.

### 3.5.2. Serveurs utilisés pour les analyses des séquences

Nous avons utilisé, dans un premier temps, la base non redondante (ADN génomique et l'ADN codant) regroupant différents organismes, aussi bien procaryotes que eucaryotes (animaux et végétaux).

Deux sites Internet ont été utilisés, proposant des programmes d'analyses de séquences similaires, mais avec des paramétrages et des liens avec des bases de données différentes. Dans les deux cas, l'information obtenue provient généralement d'autres espèces dont la séquence, nucléotidique ou protéique, est la plus proche. On obtient aussi des indications sur les conditions d'obtention de la séquence (ex : stress), par qui et dans quel laboratoire, et dans le cas de séquences codantes, sur la phase de lecture, la séquence protéique, et parfois sur la fonction. Enfin, lorsque les séquences ont été publiées, un lien est disponible avec la base bibliographique PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=PubMed>).

Le premier serveur est localisé sur le site Internet du « National Center for Biotechnology Information » à l'URL suivante: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>. Le second est localisé sur le site Internet du Centre de Ressource Infobiogen à l'URL : <http://www.infobiogen.fr/services/menuserv.html>.

Cependant, le pin maritime et les conifères en général sont des espèces assez peu étudiées, c'est pourquoi nous avons fait des recherches à partir de bases de données plus spécifiques. En effet, nous avons utilisé la base spécifique d'EST de pin loblolly, accessible à l'URL : <http://www.cbc.med.umn.edu/ResearchProjects/Pine/DOE.pine/index.html>. Ces séquences proviennent des efforts de séquençage conjugués de 2 équipes : « The Institute of Forest Genetics of the USDA Forest Service, Davis CA » et de « Forest Biotechnology Group at North Carolina State University » (Allona et al., 1998). Au 30 Mars elle contenait 32 000 EST.

Enfin, comme décrit précédemment, nous disposons de notre propre banque de pin maritime, que nous avons utilisée pour ce type d'analyse car les fragments disponibles sont en moyenne de plus grande taille (650pb en moyenne) que ceux isolés par ADNc-AFLP, amplification 3'/5'terminale ou HSS.



### 3.5.3. Logiciels utilisés pour les analyses des séquences

Dans un premier temps, nous avons cherché à déterminer les similarités au niveau de la séquence en acide nucléique entre les TDF isolés et les séquences disponibles sur les bases de données.

Pour ce type d'analyse, nous avons utilisé un logiciel mis au point par Altschul et al., (1997) qui permet de rechercher des alignements locaux, entre la séquence que l'on a isolée (query) et les séquences des bases de données, il s'agit de BlastN.

Nous avons appliqué dans un second temps des recherches au niveau protéique. Pour ce faire, nous avons utilisé deux types de logiciels. Le premier, BlastX, consiste en la comparaison des traductions conceptuelles dans les 6 phases de lecture (pour les 2 brins) de nos TDF, avec les bases de données contenant les séquences protéiques. Le second, tBlastX, compare la traduction conceptuelle dans les 6 phases de lecture (pour les 2 brins) de nos TDF, avec les séquences des bases de données traduites elles-aussi dans les 6 phases de lecture.

L'utilisation de ces logiciels s'appuie sur des analyses statistiques, dont le résultat des tests (score et *E*-value) nous renseigne sur le degré d'homologie entre les séquences. Seules des homologies présentant des scores supérieurs ou égaux à 44 et des *E*-value inférieures ou égales à  $6e^{-4}$  ont été retenues.

## 4. Electrophorèse bidimensionnelle

Les échantillons utilisés pour cette expérience sont des mélanges de 4 individus correspondant aux conditions « mot3 » (-0,08Mpa, 21jours), « m3t3 » (-0,45Mpa, 21 jours) et « mtt3 » (témoin terre, 21 jours). Les tissus analysés correspondent aux aiguilles, aux tiges ainsi qu'aux racines, des 4 individus de chacun des échantillons. Chacun des tissus prélevés a été stocké à  $-80^{\circ}\text{C}$ . Chaque gel a été répété 2 fois.

### 4.1. Extraction des protéines

L'extraction dénaturante des protéines de chacun des tissus a été réalisée selon la méthode décrite par Bahrman et al. (1996). Seule la concentration finale de protéines dans le tampon de résolubilisation a été modifiée (30  $\mu\text{l}/\text{mg}$  de culot au lieu de 15  $\mu\text{l}/\text{mg}$ ).

#### 4.2. Electrophorèse bidimensionnelle

La première et la seconde dimension ont été réalisées là encore comme décrit par Bahrman et al., (1996). Seul le volume d'extrait protéique déposé est différent : 40  $\mu$ l au lieu de 20  $\mu$ l. Les protéines ont été par la suite colorées au nitrate d'argent comme décrit par Costa et al., (1999).

#### 4.3. Analyse automatique des gels d'électrophorèse bidimensionnelle des protéines

Le matériel utilisé pour l'acquisition et l'analyse d'images des gels d'électrophorèse bidimensionnelle des protéines provient de chez Amersham Pharmacia Biotech. Après séchage, les gels ont été scannés sur « l'Image Scanner » couplé au logiciel d'acquisition d'image « LabScan ». Les analyses d'intensité des spots protéiques ont été effectuées à l'aide du logiciel « ImageMaster 2D Elite », version 3.0.

A chaque spot détecté l'analyseur d'image attribue une intensité optique intégrée correspondant à la somme des valeurs des pixels à l'intérieur du contour du spot. Pour les spots non saturés, l'intensité ainsi mesurée varie d'une part en fonction de la quantité de la protéine (différences entre conditions) et d'autre part en fonction de la coloration du gel. En effet, la coloration au nitrate d'argent est la composante majeure des variations expérimentales de la quantification des spots et tend à affecter tous les spots d'un gel de la même manière (Burstin et al., 1993). Il était donc indispensable de s'affranchir de cette variabilité expérimentale pour pouvoir comparer l'intensité des spots entre les échantillons des différentes conditions et des différentes répétitions. Un facteur de correction linéaire ( $K_{ij}$ ) calculé comme la moyenne ( $Y_{..}$ ) de l'intensité de tous les spots  $i$  (environ 1000) prise sur tous les gels  $j$ , pondérée par la moyenne de l'intensité de tous les spots  $i$  d'un gel  $j$  ( $Y_{.j}$ ), est appliqué à chaque spot analysé du gel  $j$ .

#### 4.4. Analyse quantitative entre les deux conditions pour chacun des tissus

Une analyse de variance (ANOVA) avec le facteur condition (non stressé vs. stressé) comme variable dépendante a été réalisée selon le modèle :  $Y_{ijk} = \mu + T_j + e_{ijk}$  (où  $Y_{ijk}$  est l'intensité du spot  $i$  de la répétition  $k$  dans la condition  $j$ ,  $\mu$  est la moyenne générale,  $T_j$  est l'effet du traitement  $j$ , et  $e_{ijk}$  est l'erreur résiduelle). Ce modèle permet de voir si le traitement explique de façon significative une partie de la variation de la quantité de la protéine  $i$ , autrement dit si l'application du stress hydrique a un effet sur la quantité de protéine exprimée. L'hypothèse

nulle testée est qu'il n'y a pas d'effet du traitement sur la variabilité de l'intensité du spot. Si la probabilité du test de Fischer de l'ANOVA est inférieure à 5% on rejette l'hypothèse nulle avec un risque de 5% de se tromper, c'est-à-dire de ne pas déclarer un spot significatif alors qu'il est bel et bien affecté par le traitement.

## CHAPITRE 3 : Résultats

**I. Publication 1** : Identification of water-deficit responsive genes in maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.) roots using non radioactive cDNA-AFLP, and quantitative expression analysis using reverse northern

**II. Publication 2** : Identification and characterization of water-deficit responsive genes in hydroponically grown maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.) seedlings

**III. Publication 3** : Drought differentially affects expression of a PR-10 protein, in needles of maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.) seedlings

**IV. Publication 4** : Maritime pine histones: characterization and expression patterns in drought stressed seedlings of maritime pine

**V. Identification de protéines impliqués dans la réponse au stress hydrique chez le pin maritime**

**VI. Discussion générale**

### Publication 1

Les racines jouent un rôle prépondérant chez les végétaux. Elles permettent l'ancrage et l'assimilation de l'eau et des minéraux. Chez les arbres forestiers, les racines sont le lieu privilégié des associations symbiotiques. Vis-à-vis d'un stress hydrique, elles constituent le site premier de perception d'une sécheresse édaphique. C'est aussi l'organe où sont synthétisés les facteurs régulant la réponse de l'appareil aérien, par exemple contrôlant la fermeture des stomates (ABA, éthylène...). Chez le pin maritime, peu d'études se sont focalisées sur la réponse physiologique et moléculaire du système racinaire soumis à un déficit d'alimentation en eau. Dans cet article, nous avons utilisé une technique de criblage différentiel (ADNc-AFLP) pour identifier des gènes impliqués dans la réponse au stress hydrique. L'utilisation de la culture en milieu hydroponique nous a permis de contrôler précisément l'intensité du stress par ajout de PEG 3350, ainsi que d'accéder aisément aux racines nouvellement formées (les plus efficaces pour absorber l'eau). Sur les 2500 fragments d'ADNc analysés, 33 (1,2%) ont montré une variation de type présence/absence entre les plants témoins et les plants stressés : 20 étaient sur-exprimés et 13 sous-exprimés en milieu stressé. Des analyses de type northern et RT-PCR ont permis de valider ces différences d'expression ainsi que d'étudier la spécificité tissulaire des transcrits. L'analyse de la fonction des gènes nous fournit les premières indications sur la compréhension des mécanismes de réponse moléculaire au stress hydrique, mis en place au sein des racines de pin maritime.

**Identification of water-deficit responsive genes  
in maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.) roots**

CHRISTIAN DUBOS and CHRISTOPHE PLOMION.

Equipe de Génétique et Amélioration des Arbres Forestiers, INRA Pierroton, BP 45, 33610  
Cestas, France.

Correspondence: C. Plomion

Tel: +33-5-57-97-90-76

Fax:+33-5-57-97-90-88

E-mail: [plomion@pierroton.inra.fr](mailto:plomion@pierroton.inra.fr)

**Soumis** à Plant Molecular Biology

#### **Abstract.**

Root adaptation to soil environmental factors is very important to maritime pine, the main conifer species used for reforestation in France. The range of climates in the sites where this species is established varies from flooded in winter to drought-prone in summer. No studies have yet focused on the morphological, physiological or molecular variability of the root system to adapt its growth to such environment. We developed a strategy to isolate drought-responsive genes in the root tissue, in order to identify the molecular mechanisms that trees have evolved to cope with drought (the main problem affecting wood productivity), and to exploit this information to improve drought stress tolerance. In order to provide easy access to the root system, seedlings were raised in hydroponic solution. Polyethylene glycol was used as an osmoticum to induce water deficit. Using the cDNA-AFLP technique, we screened more than 2500 transcript derived fragments, of which 33 (1.2%) showed clear variation in presence/absence between non stressed and stressed medium. The relative abundance of these transcripts was then analysed by reverse northern. Only two out of these 33 genes showed significant opposite behavior between both techniques. Finally, for 16 clones, classical northern analysis or RT-PCR were used to validate these results, and to investigate gene expression in other tissues. The identification and characterization of water-deficit responsive genes in roots provide the emergence of physiological understanding of the patterns of gene expression and regulation, involved in the drought stress response of maritime pine.

#### **Key words**

Drought stress, Root, *Pinus pinaster*, cDNA-AFLP, Reverse northern, Gene expression.

## Introduction

Maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.) is widely established in monospecific stands and stretches out over more than 4 million ha in southwestern Europe and northern Africa. In the Aquitaine region (France) this species covers a surface of 1 million ha on two main sites. The first one, corresponding to few percent of the forested area, concerns natural stands on the dune along the Atlantic coast. The second one is a sandy podzol moorland ranging from dry (with *Caluna vulgaris* and *Erica cinerea*) to semi humid (with *Pteridium aquilinum*) and humid (with *Molinia caerulea*) lands. It comprises most of the forested area that was artificially established in the late nineteenth century. A compact (hardered) layer (B-Fe horizon) called “iron pan” 0.3 to 1 m deep or more, is frequently observed in this second area. In summer, the ground-water level is fairly deep (1.6 to 2 m) and trees may suffer from drought despite the considerable annual rainfall (700 to 1200 mm). In winter, the water table level goes up to 0.3 m deep and trees are faced with water logging. A maritime pine breeding program was started in the early sixties to provide well growing material adapted to the climate and soil of the Aquitaine region. So far, adaptation features have not precisely been considered as selection criteria, namely due to the complex nature of drought and water-logging tolerance.

Genetic improvement of forest trees is a very long process compared to that of annual crops. From the selection to the harvesting of improved varieties, *via* seed production in seed orchards, it may take more than half a century for fast growing conifers. At this time scale, climatologists have predicted a global climate change with an increase in temperature [1]. Therefore, the genotypes used in tree breeding programs should be selected for their adaptation to current but also future climatic conditions if major losses are to be avoided. Perhaps a more important result of water stress (too much or too little) is the plants increased susceptibility to certain insects and diseases. In this context, an interdisciplinary effort was developed to investigate the physiological, genetic and molecular response of maritime pine faced with drought. Our main objective is to provide basic knowledge required to devise marker assisted breeding strategies for adapting maritime pine to current and future climatic conditions.

While several studies have concentrated on the physiological [2, 3], biochemical [4, 5] and molecular [6, 7] responses of maritime pine photosynthetic tissue to drought, no studies have yet focused on the root system, although this organ plays an important role in drought stress resistance and recovery. Root size and architecture are important factors for determining yield performance, particularly under conditions of limited water availability [8,



9 and references herein]. Roots are also actively involved in the perception and transduction of the drought stress signal. The information seems to be transferred to the whole plant *via* growth regulators (ABA or ethylene), and induces stomatal closure [10, 11, 12]. Studies describing the biochemical and molecular events in drought-stress roots have been difficult, mainly because of the complexity prevailing in field test, i.e. with root-soil-microorganism interactions [13]. Therefore, much of the work has been carried out using plants grown under simple, controlled conditions. In this respect, hydroponics presents several advantages: roots are easily accessible, growing conditions can be controlled precisely and monitored continuously. However, hydroponics limits the investigations to the young stages of growth. In addition, roots grow under conditions that are very different from those present in the field. Hydroponic culture has been used as a procedure for studying the physiological response to drought in crop plants [14, 15] and in trees [5]. Pattern analysis of gene expression using hydroponic culture has also been used to describe molecular events involved in the drought stress response [16].

Complex molecular responses to environmental stress can be studied by pattern analysis of gene and protein expression. With respect to transcriptome analysis, several techniques are available. These include Differential Display-PCR (DDRT-PCR, 17), Representational Difference Analysis (RDA, 18), Serial Analysis of Gene Expression (SAGE, 19), DNA-chip [20], cDNA microarray [21, 22], Subtractive Suppressive Hybridization (SSH, 23), cDNA-AFLP [24] and derived techniques [25]. Among these methods, mRNA-fingerprinting techniques such as DDRT-PCR and cDNA-AFLP have the advantage of technical simplicity, requiring a small quantity of mRNA [26] and the screening of a large number of different cDNAs. However, the most significant limitations of DDRT-PCR are reproducibility, the generation of false positives [27] and the meagre information on sequences mostly corresponding to 3'-ends of mRNAs. cDNA-AFLP overcomes these problems [24, 28, 29] and is less labor intensive. Here we first report on the identification of 33 putative drought-stress regulated genes in maritime pine root using non radioactive cDNA-AFLP. Reverse northern showed that 18 and 17 of these genes are significantly regulated by the applied stress in root and aerial part, respectively. Finally, we investigate the expression level of few selected genes by classical northern or RT-PCR.

## Materials and Methods

### Plant material

*Pinus pinaster* seeds were sterilized in 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 15 minutes before 24h imbibition in sterile water. After 10 days of germination on moistened filter paper, 100 uniform seedlings were transferred to an aerated nutrient solution [30]. After three weeks of growth, drought stress treatment was applied to half of the seedlings by lowering the osmotic potential of the nutrient solution (-0.45 MPa) using polyethylene glycol (PEG3350, Sigma-Aldrich and Co, Saint Louis, Missouri, USA) as an osmoticum. The other half was kept in the Seillac medium (-0.08 MPa) and used as the control treatment. The duration (three weeks) and the intensity (-0.45 MPa) of the stress were chosen among 16 combinations, resulting from a factorial design where four levels of stress (-0.15, -0.30, -0.45 and -0.60 MPa) were crossed with four stress durations (1, 10, 21 and 45 days). In the chosen condition, mortality rate reached 50%, ensuring that the stress was well established, but also that a certain adaptation occurred in the surviving seedlings. The objective of our study was indeed to investigate the mid-term response put in place by the surviving plants, under a precisely controlled drought stress treatment. Finally, six week-old seedlings were sampled from both conditions, immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until use. Media were changed once a week to avoid fungi contamination. The experiment was conducted in a growth chamber under a 16/8h light/dark regime, temperature 24/18°C, hygrometry 45/70%, and a quantum flux of 260  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ .

### RNA preparation and cDNA synthesis

RNA isolation constitutes the basis of gene expression studies. Total RNA extraction from conifer species is critical, because considerable amounts of polysaccharides, polyphenol and other secondary metabolite compounds are present in the extraction solution and limit RNA extraction yield and further enzymatic reactions [31]. Five different protocols were tested (data not shown), and the one described by Chang et al. [32] was found to be the most efficient. To optimize both the yield and the purity of total RNA, a slight modification was incorporated into the protocol consisting in doubling the ratio between the plant material and extraction buffer (1g of tissue for 15ml of extraction buffer). From the two bulks of 50 seedlings (corresponding to the non stressed and stressed treatments), total RNA was extracted from roots, needles and stems. The extracts were purified by digestion at 37°C with

50U of DNase RQ1 RNase free (Promega, Madison, WI, USA). Total RNA was cleaned using the RNeasy® Plant kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) according to the manufacturer's procedure, and the concentration was determined spectrophotometrically. Spectrophotometrical analysis revealed high RNA quality with a A260/A280 ratio of between 1.8 and 2.0. Poly(A+) RNA was prepared from 100µg of total RNA, using the Oligotex™ kit (Qiagen) as described by the manufacturer. Double-stranded cDNA synthesis was carried out with the cDNA synthesis kit (Promega) according to the kit protocol and was chloroform-isoamylalcohol (24:1) extracted, ethanol-precipitated and taken up in a final volume of 40µl of DEPC-treated- H<sub>2</sub>O.

All PCRs were performed using the GeneAmp® PCR system 9700 (Perkin Elmer, Foster City, CA, USA), and the *Taq* polymerase and buffer from Life technologies-Gibco BRL (Gaithersburg, MD, USA).

#### **cDNA quality verification**

The representativeness of low and high abundant messengers was verified by directed PCR using a highly (CAD: cinnamyl alcohol dehydrogenase, EC 1.11.1.7) and a weakly (a transcription factor of the MYB family) expressed gene [33]. In addition, since primer pairs of both genes were designed in exonic regions surrounding one single intron, it was also possible to check the quality of the RNA extraction in terms of genomic DNA contamination. Such verifications are considered to be necessary steps before starting the cDNA-AFLP protocol or further expression analysis in order to avoid false positives [34]. PCRs were performed in 25µl of 1X buffer, containing 0.1mM dNTPs, 0.2µM of each primer, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5U *Taq* DNA Polymerase and 1µl (2ng) of cDNA. Amplifications were carried out following the cycling parameters: preliminary denaturation (4min, 94°C), then 35 or 40 cycles of denaturation (30s, 94°C), annealing (30s, 55°C or 58°C, respectively) and extension (1min, 72°C) were used for the amplification of CAD and Myb genes, respectively, and final extension (10min, 72°C).

#### **Non radioactive cDNA-AFLP reaction**

The cDNA-AFLP procedure was applied to the root system of the seedlings. The digestion-ligation step was undertaken at 37°C for 3h in a total volume of 15µl, containing 10µl (50ng) of cDNA, 1.5U of restriction enzymes (*Pst*I, *Mse*I), 0.5U of *T4* DNA ligase, 0.15mM ATP,

1pmol *Pst*I adaptor, 10pmol *Mse*I adaptor in a 1X One Phor All buffer. Enzymes and buffers were obtained from Amersham-Pharmacia Biotech (Uppsala, Sweden). Digested-ligated cDNA fragments were diluted ten-fold and used as a template for the first amplification (preamplification). Preamplification was performed in a total volume of 25µl of 1X buffer, containing 0.2mM of each dNTP, 0.25µM of each non selective primer (see below), 1.2mM MgCl<sub>2</sub>, 0.4U *Taq* DNA Polymerase and 10µl of diluted cDNA fragments. PCR was carried out using the following procedure: preliminary denaturation (4min, 94°C), then 28 cycles of denaturation (30s, 94°C), annealing (30s, 60°C) and extension (1min, 72°C). 5µl of preamplification product were fractionated on an ethidium bromide 1% agarose gel. A smear was present near 500bp. The preamplification product was diluted 35 fold to be used as starting material for the second amplification reaction (selective amplification). Primers were complementary to the adaptors *Pst*I and *Mse*I, with one or two additional selective 3'-end nucleotides, as described below:

Adaptors:

5'-GACGATGAGTCCTGAG-3': *Mse*I Adaptor1

5'-TACTCAGGACTCAT-3': *Mse*I Adaptor2

5'-CTCGTAGACTGCGTACATGCA-3': *Pst*I Adaptor1

5'-TGTACGCAGTCTAC-3': *Pst*I Adaptor2

Primers:

5'-GATGAGTCCTGAGTAA-3': *Mse*I primers (non selective)

5'-GATGAGTCCTGAGTAAX-3': *Mse*I primers (selective)

X: A, C, G, AC, AT, CC, GA and GT

5'-GACTGCGTACATGCAG-3': *Pst*I primers (non selective)

5'-GACTGCGTACATGCAGX-3': *Pst*I primers (selective)

X: G, AG, AT, CA, CC, CG, CT, GA, GT and TG.

Selective PCR reactions were performed in 10µl of 1X buffer containing: 0.1mM of each dNTP, 0.15µM *Pst*I and 0.30µM *Mse*I primers, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5U *Taq* DNA Polymerase and 2.5µl of the diluted preamplification. Selective amplifications were carried out using the following cycling parameters: preliminary denaturation (4min, 94°C), 1 cycle of 30s at 94°C,

30s at 65°C, 1min at 72°C, 13 cycles with the annealing temperature decreasing 0.7°C per cycle, followed by 23 cycles of 30s at 94°C, 30s at 56°C and 1min at 72°C. Resulting products were run on 4% polyacrylamide sequencing gel at 80 Watts for 2.5 hours.

#### **Radioactive cDNA-AFLP reaction**

Radioactive cDNA-AFLP reaction was performed as described for the non radioactive reaction, excepted that the 5'-end *Pst*I primers were labeled with <sup>33</sup>P using Amersham-Pharmacia Biotech enzyme and buffer. Primer labeling was performed in 25µl of 1X OPA buffer, with 50µCi  $\gamma^{33}$ P-dATP, 6µM *Pst*I primers, 5U *T4* Kinase, incubated for 1h at 37°C. The reaction was stopped by 10min incubation at 80°C.

#### **Isolation of cDNA-AFLP fragments from silver stained polyacrylamide gel and cloning**

Gels were silver stained according to Bassam et al. [35] with the following modification: 30min fixation in 10% acetic acid, 3min wash in distilled water (4 times), 30min staining in a 0.1% silver nitrate, 0.05% formaldehyde solution, 10s wash in distilled water, and revelation as required in a 4°C pre-cooled solution containing sodium carbonate (30g/l), formaldehyde (0.05%) and sodium thiosulfate (2mg/l). Coloration was stopped by immersing the gels for 15min in 10% acetic acid. Then gels were rinsed for 30min in distilled water and dried for 16h at room temperature. After gel drying, informative fragments were rehydrated for 30min with 5µl of distilled water, eluted directly in another 5µl of distilled water [36] and used as a matrix for re-amplification by PCR under the same conditions as for the selective PCR reaction. TDFs (Transcript-Derived Fragments) were separated on a 2% agarose gel and purified using a PCR product purification kit (Promega). Cloning was achieved using the TOPO TA-cloning® kit (Invitrogene, Carlsbad, CA, USA). Conditions were used as recommended by the manufacturer.

#### **Sequencing and analysis of cDNA clones**

Sequence analysis was carried out using the Li-Cor 4000 automated sequencer (Li-Cor Inc, Lincoln, Nebraska, USA). For DNA sequencing, template DNA was prepared by plasmid extraction [37]. Sequence reaction was performed with the ABI Prism™ Dye Primer Cycle Sequencing Core Kit from PE applied biosystems (Perkin Elmer), using a Dye IRD 800 M13 forward primer (5' TGACCGGCAGCAAAATG 3', MWG Biotech, Ebersberg, Germany). Nucleotide sequences were loaded in National Center for Biotechnology Information (NIH, USA) form, for BLAST-X search. Any similarity with a score of over 46 or an *E*-value of less

than  $10^{-3}$  was considered to be a hit. Each differentially expressed TDF was also compared (BLAST-N search) to the maritime pine EST (Express Sequence Tag) database containing 2064 tags (J-M Frigerio, unpublished) in order to obtain more sequence information toward the 3'- or 5'-end. This comparison gave successful results for clones Pp.rp9, Pp.rp17, and Pp.rp22.

#### 3'-end RACE cloning

Amplification of the 3'-end was performed for clones Pp.rp2 and Pp.rp23 using the 3' RACE kit for rapid amplification of cDNA ends (Life Technologies-Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA). Reverse transcription was carried out using total RNA from stressed roots (5 $\mu$ g) in the presence of an adaptor poly(T) tail (5' GGCCACGCGTCGACTAGTACTTTTTTTTTTTTTTTTTT 3') using the SuperScript<sup>TM</sup> II reverse transcriptase as described by the manufacturer. Second strand synthesis was carried out by PCR amplification (35 cycles of 94°C for 60s, 55°C for 60s, 72°C for 90s and a final extension at 72°C for 10 min) with the AUAP adaptor primer on the poly(A) tail (5' GGCCACGCGTCGACTAGTAC 3') and the 5' proximal Pp.rp2 primer (5' GCCGAGCAGATTGCCTTTC 3') or the Pp.rp23 primer (5' AGCCGCTGGTGTGACTGTT 3'). The reaction products were purified, cloned and sequenced as described above to isolate of cDNA-AFLP fragments.

#### Production of nylon membranes for reverse northern, and data analysis

Inserts of sequenced cDNA clones were amplified by PCR in 50 $\mu$ l reaction volumes, using 2 $\mu$ M of primers (M13 forward: 5' TGACCGGCAGCAAATG 3' and reverse: 5' GGAAACAGCTATGACCATG 3') that were complementary to vector sequences flanking both sides of cDNA inserts. The thermal cycling parameters were 94°C (5 min) followed by 40 cycles of 94°C (45s), 55°C (45s) and 72°C (45s), and a final extension step at 72°C (10min). PCR products were diluted to a final concentration of 5ng/ $\mu$ l, denatured with NaOH (0.2M final concentration) for 10min, and spotted onto GeneScreen Plus® nylon membrane filters (8x12cm, NEN Life Sciences Products Inc, Boston, MA, USA) using Millipore 96-well dot-blot apparatus. Each clone was spotted on 12 different membranes. Membrane were then baked 1h at 80°C. Controls were spotted at specific positions on the filters, consisting on distilled water and 15 replicates of a cDNA corresponding to a *Pisolithus trinatorius* receptor tyrosine Kinase/Ras (kindly provided by S. Duplessis, INRA-Nancy, France) as internal quantification standard (not expressed in plant, [38]).

Total RNA from root and aerial part (stems and needles combined) were used to prepare complex probes by reverse transcription using the SMART-PCR cDNA Synthesis Kit (Clontech, Palo Alto, CA, USA). Labelling of the cDNA probes was done in the presence of 50 $\mu$ Ci of  $\gamma^{32}$ P-dATP and 50 $\mu$ Ci of  $\gamma^{32}$ P-dCTP using the Prime-it® II Random Primer Labeling kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA) according to the manufacturer's instructions.

Arrayed filters were pre-incubated in a hybridization solution (5X SSC, 5X Denhardt's solution, 0.5%SDS, 500 $\mu$ g/ml shared salmon sperm DNA) for 4h at 65°C. Then the filters were incubated in the same solution with radiolabeled probes at 65°C for 24h. Half of the membrane were hybridized with the probe (root and aerial part) corresponding to the control condition, the other half with the probe corresponding to the drought stressed condition (root and aerial part). The hybridized filters were washed successively for 5min in 2X SSC, 0.5% SDS at room temperature, 20min in 2X SSC containing 0.1% SDS (65°C), 20min in 1X SSC containing 0.1% SDS (65°C), 20min in 0.5X SSC containing 0.1% SDS (65°C), 40min in 0.1X SSC containing 0.1% SDS (65°C) and then 10min in 0.1% SDS (65°C). Filters were then exposed to Konica medical X-ray film (Tokyo, Japan) for 1 to 3 days.

The raw image were digitalized using the *LabScan* (Amersham-Pharmacia Biotech) software. Detection and quantification of the signals representing hybridized DNA were performed with the *ImageMaster 2D Elite* software version 3.0. (Amersham-Pharmacia Biotech). Local background value for each membrane was calculated on the basis of 16 positions with no DNA-spotted area. Net signal was determined by subtraction of this mean background from the intensity of each spot. The probe-to-probe variance was filtered out using signal intensities of the receptor tyrosine Kinase/Ras spotted at 15 locations on the filters (interfilters normalization).

Previous to analysis of variance (ANOVA), the distribution of the spot intensity was normalized by transforming (Log base 10) the corrected data. The effect of the treatment (control *versus* stress) was then tested using the following model:  $Y_{ijk} = \mu + C_j + \varepsilon_{ijk}$ , where  $Y_{ijk}$  is the intensity value of the spot  $i$  ( $i = 1-33$ ), in condition  $j$  ( $j = 1-2$ ) for replicate  $k$  ( $k = 1-3$ ),  $\mu$  is the mean intensity of the spot in all conditions,  $C_j$  is the effect of condition  $j$ , and  $\varepsilon_{ijk}$  is the residual term.

**Table 1:** Primer pairs used for RT-PCR analysis.

Clone	Size (bp)	Upper primer	Lower primer	Ta (°C)
Pp.rp4	101	GATGCGGAAGCTCTGTTTCA	GCCACCCTGATTTCCAGTG	60
Pp.rp33	146	CGATGGCGGTGACAC	CCCCAGTAGTAGTCTCCTCA	55
Pp.rp9	117	AGCAGGGGTGAGAAATGTTC	TCGGCTCAGTTTGAATGTA	52
Pp.rp19	224	AAAATGACCGGTGCTGTTTC	CGGGCGTCTTTCTCCTTCT	55
Pp.rp18	154	CGGCCTCATAGACATTGT	TTCGCTAGCAGAAGATTAT	54
Pp.rp20	243	TGCCAATTATAGCTGATACA	TTAGCATGGAGGAGTCATAC	52
Pp.rp23	146	AGCCGCTGGTGTGACTGTT	TTGCTGCCACTTTCCAATCA	55
Pp.rp6	155	CATCGCCACCATCTCT	AGACGCAGTAACAACAGAAC	52
Pp.rp11	243	AAATGCCAGCGAAGGTCT	AGCAATGGCGGAAGAGTCTC	52
Pp.rp2	300	GCCGAGCAGATTGCCTTTC	GCAGCCCTCCAAGACAGATT	60
Pp.rp3	264	AAATGCCCAATTCTCTAAA	GGAGCGAACATGATTATGAA	54
PAL	450	TAGCCAAGAAAACCCTGAG	ACTGATAGCGTCGTAAACCA	54
CAD	200	GTCCCCTTACACTTACAATC	ATCCCCACCACTTCAT	54
4CL	600	CCCCGTCAAATCTGGCTCCT	GGGCGCTTACTCTGCACCAC	58
Ubiquitin	476	CAGCAAGCGCATTCAA	ATTCTTCCCTGGCTTTCATA	52 to 60

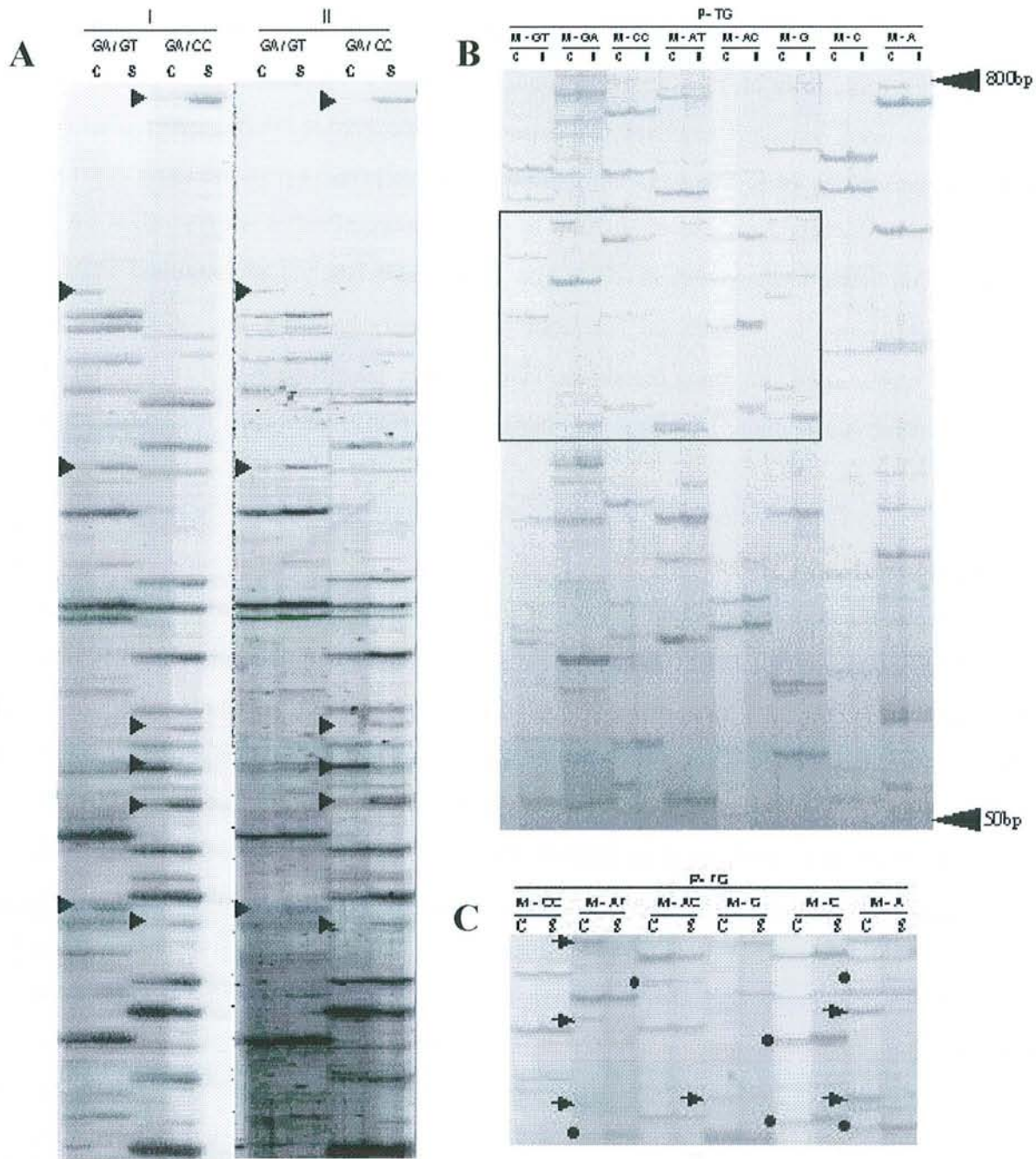


#### **Northern blot hybridization**

Aliquots of 10µg of total RNA extracted from the stem, needle and root were denatured and separated by electrophoresis in 1% agarose formaldehyde gel. RNA was transferred onto a nylon membrane using standard capillary techniques. Specific probes of the insert plasmid vector were generated by PCR using M13 forward and reverse primers with the same thermal cycling parameters described for the production of cDNA arrays. Probes were purified on a S300-HR column (Amersham-Pharmacia Biotech).  $\gamma^{32}\text{P}$ -dATP labeling of amplified inserts was performed using the Prime-it® II Random Primer Labeling kit (Stratagene). Hybridizations was carried out using membrane manufacturer's instruction and then exposed to Konica medical X-ray film. Ethidium bromide stained ribosomal RNA was used as a control.

#### **Reverse Transcription PCR**

Total RNA from the root system and the aerial parts (stems and needles combined) were separately DNase RQ1 RNase free (Promega) treated for 1h at 37°C in the presence of RNase inhibitor (RNasin, Promega) and purified through an RNeasy column (Qiagen). Aliquots of 2µg digested total RNA were reverse transcribed, using Superscript II enzyme (Gibco BRL) with anchored oligo-dT, and then diluted 4 fold. Each step was carried out as described by the manufacturer. PCRs were performed in 50µl of 1X buffer (Gibco BRL) containing 0.1mM dNTPs, 0.2µM of each primer (1 primer pair for ubiquitin and 1 primer pair for the TDF), 2mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5U *Taq* DNA Polymerase (Gibco BRL) and 2µl of diluted single strand cDNA. Amplifications were carried out using a Perkin Elmer 9700 thermocycler with the following cycling parameters: preliminary denaturation (4min, 94°C), then denaturation (45s, 94°C), annealing (45s, 52°C to 62°C), extension (1min, 72°C) and final extension (4min, 72°C). The position and length of the primers were chosen according to their thermodynamic parameters using Oligo Primer Software version 4.1 [39]. The list of primer pairs and their annealing temperatures are presented in Table 1. 10µl of PCR product were sampled at 15, 20 and 35 cycles. When the final PCR product (35 cycles) showed the expected size based on the sequence information, PCR products corresponding to 15 and 20 cycles were separated by electrophoresis in 1.2% agarose gel and transferred onto a nylon membrane as described for the northern analysis. Specific probes of the plasmid vector insert were generated by PCR using M13 forward and reverse primers, using the same PCR buffer conditions and thermocycler as described for the RT-PCR. The thermal cycling parameters were 94°C (5



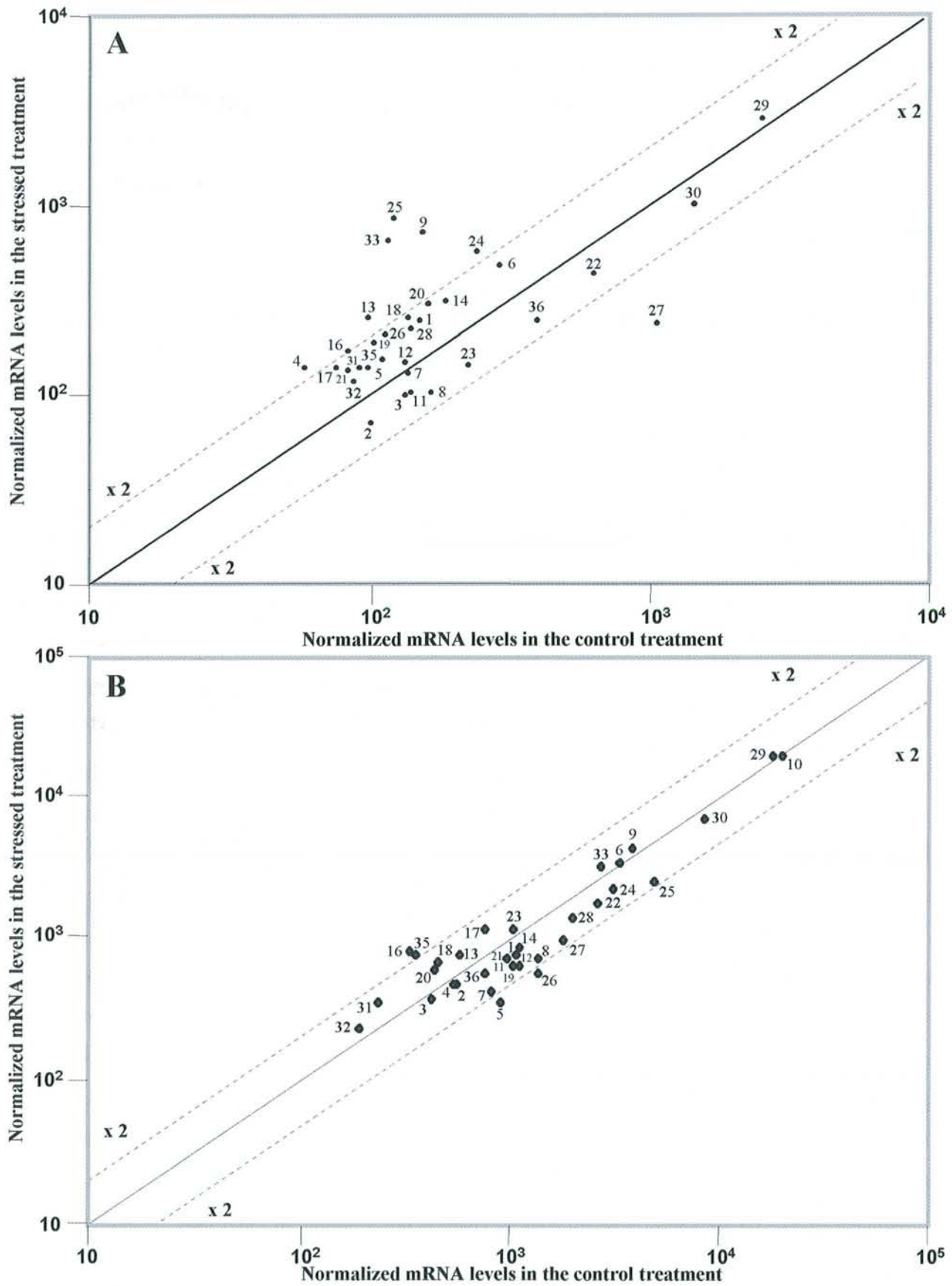
**Figure 1:** (A) Comparison between cDNA-AFLP silver stained (panel I) and radiolabeled (panel II) gels, using one *Pst*I selective primer (*Pst*I-GA) and two *Mse*I selective primers (*Mse*I-CC and *Mse*I-GT). Arrows indicate differentially expressed fragments. C: control conditions, S: stress conditions. (B) Silver stained cDNA-AFLP fingerprint. 8 different Primer Enzyme Combinations were used, corresponding to one *Pst*I selective primer (P) and 8 *Mse*I selective primers (M). C: control conditions, S: stress conditions. (C) Zoom of Figure 1.B (squared). Arrows indicate Transcript Derived Fragments (TDFs) showing variation in “presence/absence”, and dots indicate TDFs showing quantitative variations.

min) followed by 28 cycles of 94°C (45s), 55°C (45s) and 72°C (45s), and a final extension step at 72°C (10min).  $\gamma^{32}\text{P}$ -dATP labeling and purification of the amplified inserts were performed as described for the northern analysis.

## Results

### Comparison between silver stained and radioactivity-labeled cDNA-AFLP

The sensitivity of these two methods was compared, using the same radioactive selective PCR. First the amplification product was separated in a polyacrylamide gel, silver stained and, after scanning the gel, exposed to an X-ray film. No difference in terms of sensitivity, fragment contrast and fingerprinting pattern was detected between the gel and the film (Figure 1.A). However, the silver staining method presents major advantages over radioactivity labeling: it is not hazardous to health and also less expensive and less time-consuming since it does not include checking cDNA synthesis by  $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP incorporation, labeling of selective PstI primers with  $^{33}\text{P}$  isotopes, or film exposition to X-rays for several days. With the radioactive labeled primer, 5 days were necessary for selective PCR revelation with fresh  $\gamma^{33}\text{dATP}$ . In contrast, within the same period of time and using the silver-staining protocol, selective PCR was separated on acrylamide gel, developed, analyzed and differentially expressed TDFs reamplified, cloned and some were sequenced. With an average of 34 bands per PEC, 24 PEC run per gel, and 1 gel per day, a total of 816 fragments corresponding to 10 differentially expressed TDFs (1.2% of the TDFs showing variation in presence/absence, see below) could be obtained using the silver staining method in a single working day. Compared to the use of radioactivity, where autoradiographic films have to be repositioned on polyacrylamide gels before the segments corresponding to differentially amplified cDNA are excised, the silver staining protocol makes it possible to visualize the fragments to be sampled, ensuring isolation of pure amplified cDNA products and further avoiding false positive fragments being obtained. In our study, sequences were performed on 5 different clones for 10 TDFs, and in all cases the same sequences were obtained, suggesting that only a single species of cDNA molecule was present in each sampled band. In each case, sequence analysis also revealed the presence of the selective primers in the 5' and 3' ends, confirming the validity of the technique.



**Figure 2:** Scatter plot showing expression level of the 33 transcript-derived fragments isolated from root using cDNA-AFLP, between the control and drought-stress conditions (A) in roots and (B) aerial part. For each clone, numbered as in table 2, transcript levels are expressed in arbitrary units and plotted on a log-log scale. Dotted lines indicate 2-fold expression differences between control and stressed conditions.

### **Identification of differentially expressed genes using cDNA-AFLP**

cDNA fragments were amplified using 80 primer-enzyme combinations (PECs) and revealed by silver staining. An average of 34 TDFs per PEC was obtained, resulting in approximately 2720 screened cDNA fragments. Fragment sizes ranged from 50 to 800 pb (Figure 1.B). The reproducibility of the silver staining method was assessed using cDNA-AFLP templates prepared from 4 independent RNA extractions of the same sample. There was little or no variation between the 4 batches of cDNAs (data not shown): the cDNA-AFLP profile appeared to be identical in terms of both banding patterns and intensity of the amplified products.

Approximately 5.5% (150) of the TDFs were found to be differentially expressed between the non-stressed and drought-stressed conditions (Figure 1.C), of which 22% (33 fragments) displayed clear variation in “presence/absence”. All TDFs showing such variation were sampled from the gel, re-amplified and cloned. Co-migration between re-amplified products and corresponding selective PCRs, on 4% polyacrylamide sequencing gel, ensured both the quality and the specificity of the purified TDFs. A search in the GenBank® database showed that 16 of the 33 TDFs corresponded to known function genes (Table 2), whereas seven corresponded to hypothetical protein, three to EST and seven did not match any sequences in the public databases.

### **Quantitative analysis of gene expression by reverse northern**

The 33 TDFs isolated previously were analysed using reverse northern to both validate the result of the cDNA-AFLP experiment, and quantitatively measure the relative abundance of the transcripts in root and aerial part.

In root, a marked change was seen in the global pattern of expression of the gene studied between both conditions (Figure 2.A). For most of the clones (28/33) the nature of the variation (increase, decrease) was identical between the cDNA-AFLP and reverse northern (Table 2). However, in respect to the degree of variation, the qualitative variants (presence/absence) observed in the cDNA-AFLP, always showed a quantitative variation in reverse northern. This striking result demonstrates that none of the studied genes is in fact specifically expressed in either the non stressed or the drought stressed condition. For the remaining clones (5/33), the nature of the variation was different between both procedure, but only two (Pp.rp23 and Pp.rp21) presented a significant difference in spot intensity based on the ANOVA model. Surprisingly, the expression pattern of Pp.rp23 (NAD-dependent formate dehydrogenase 1A) was similar between cDNA-AFLP and RT-PCR (Figure 4.C). To explain

**Table 2:** Homologies of sequences of AFLP fragments to sequences in databases. All are BLASTX scores.

Clone	Pst/Mse*	Size (bp)	Accession no.	Behavior in roots				Behavior in aerial part		Homology	Accession no.	Species	BLASTXscore/Evalue
				cDNA-AFLP	Reverse northern**			Reverse northern**					
Pp.rp1	CT/AC	229	AJ300717	+	↑	(1.59)	S.	↓	(0.74)	aldehyde dehydrogenase (NAD+)	T04770	<i>Arabidopsis thaliana</i>	98 / 3e-20
Pp.rp6 <sup>d</sup>	CT/GA	279	AJ300726	+	↑	(1.60)		↑	(1.02)	ABA and water deficit inducible protein pLP3	AI813225	<i>Pinus taeda</i>	434 / e-123
Pp.rp9 <sup>a,c,d</sup>	CT/GA	243	AJ300718	+	↑	(4.52)	S.	↑	(1.15)	glycolate oxidase (EC 1.1.3.15)	T07032	<i>Lycopersicon esculentum</i>	66 / 5e-11
Pp.rp16	CC/AT	399	AJ300719	+	↑	(1.96)	S.	↑	(2.46)	ATPase	AAD39325	<i>Arabidopsis thaliana</i>	164 / 3e-40
Pp.rp17 <sup>a,c</sup>	CC/AT	337	AJ300720	+	↑	(1.79)	S.	↓	(0.70)	oxylase-like protein	BAB01696	<i>Arabidopsis thaliana</i>	132 / 20e-30
Pp.rp18 <sup>d</sup>	CC/AT	293	AJ300729	+	↑	(1.77)	S.	↑	(1.47)	Putative serine/threonine protein kinase	BG275733	<i>Pinus taeda</i>	66 / 2e-08
Pp.rp23 <sup>b,d</sup>	CA/GT	226	AJ300721	+	↓	(0.63)	S.	↑	(1.10)	NAD-dependent formate dehydrogenase 1A (EC 1.2.1.2)	AAF19435	<i>Arabidopsis thaliana</i>	109 / 6e-24
Pp.rp26	G/AT	246	AJ300722	+	↑	(1.77)	S.	↓	(0.41)	xyloglucan endotransglycosylase XET1 (EC 2.4.1.207)	AAF80590	<i>Asparagus officinalis</i>	145 / 1e-34
Pp.rp33 <sup>d</sup>	GA/CC	283	AJ300723	+	↑	(5.29)	S.	↑	(1.24)	S-adenosyl-l-homocysteine hydrolase (EC 3.3.1.1)	AF161705	<i>Lycopersicon esculentum</i>	178 / 1e-44
Pp.rp35	GA/AT	282	AJ300737	+	↑	(1.37)		↑	(2.11)	Putative RAS-related protein	BF517722	<i>Pinus taeda</i>	208 / 2e-51
Pp.rp4 <sup>d</sup>	CT/AT	263	AJ300725	+	↑	(2.32)	S.	↓	(0.87)	hypothetical protein C7A10.150	CAB16777	<i>Arabidopsis thaliana</i>	88 / 2e-17
Pp.rp13	CG/GA	230	AJ300727	+	↑	(2.50)	S.	↓	(1.37)	hypothetical protein At4g28290	NP_194558	<i>Arabidopsis thaliana</i>	44 / 3e-04
Pp.rp19 <sup>d</sup>	CC/AT	272	AJ300730	+	↑	(1.75)	S.	↓	(0.63)	hypothetical protein F11B9.22	AC073395	<i>Arabidopsis thaliana</i>	72 / 1e-12
Pp.rp20 <sup>d</sup>	AG/CC	325	AJ300731	+	↑	(1.84)	S.	↑	(1.38)	hypothetical protein T7H20_230	CAB82991	<i>Arabidopsis thaliana</i>	91 / 4e-22
Pp.rp25	G/GT	209	AJ300732	+	↑	(6.74)	S.	↓	(0.52)	EST	AW754688	<i>Pinus taeda</i>	46 / 11e-03
Pp.rp14	CC/A	319	AJ300728	+	↑	(1.61)	S.	↓	(0.75)	no hit			
Pp.rp24	G/GT	210	AJ297307	+	↑	(2.26)	S.	↓	(0.73)	no hit			
Pp.rp29	G/G	402	AJ300734	+	↑	(1.09)		↑	(1.06)	no hit			
Pp.rp31	GA/GT	192	AJ300735	+	↑	(1.48)		↑	(1.47)	no hit			
Pp.rp32	GA/GT	192	AJ300736	+	↑	(1.31)		↑	(1.20)	no hit			
Pp.rp2 <sup>b,d</sup>	CT/AC	424	AJ297297	-	↓	(0.68)		↓	(0.83)	caffeic acid ortho-methyltransferase	AAD24001	<i>Pinus radiata</i>	136 / 6e-44
Pp.rp3 <sup>d</sup>	CT/AC	430	AJ297298	-	↓	(0.73)		↓	(0.86)	putative RING zinc finger	AAF07375	<i>Arabidopsis thaliana</i>	100 / 1e-20
Pp.rp7 <sup>c</sup>	CT/GA	309	AJ297299	-	↓	(0.91)		↓	(0.44)	translocase SecA	S65668	<i>Pisum sativum</i>	189 / 1e-47
Pp.rp21	AG/CC	122	AJ297300	-	↑	(1.60)	S.	↓	(0.76)	cell division protein FtsH	BAB09632	<i>Arabidopsis thaliana</i>	69 / 8e-12
Pp.rp22 <sup>a,c</sup>	AG/G	362	AJ297301	-	↓	(0.67)		↓	(0.66)	histone H2B	Y12576	<i>Arabidopsis thaliana</i>	150 / 3e-36
Pp.rp36 <sup>c</sup>	GA/GT	279	AJ297302	-	↓	(0.59)		↓	(0.74)	hydrophobic LEA	Q9ZRF8	<i>Oryza sativa</i>	75 / 1e-13
Pp.rp5	CT/AT	236	AJ297303	-	↑	(1.36)		↓	(0.39)	hypothetical protein A12g38820	AAD25563	<i>Arabidopsis thaliana</i>	61 / 2e-09
Pp.rp11 <sup>c,d</sup>	CG/AT	293	AJ297305	-	↓	(0.72)		↓	(0.74)	hypothetical protein orf4	CAA66809	<i>Arabidopsis thaliana</i>	68 / 4e-11
Pp.rp8	CT/GT	243	AJ297304	-	↓	(0.59)		↓	(0.52)	hypothetical protein C99174	BAA82391	<i>Arabidopsis thaliana</i>	59 / 7e-09
Pp.rp27	G/AT	140	AJ300733	-	↓	(0.22)	S.	↓	(0.54)	EST	BI202735	<i>Pinus taeda</i>	98 / 2e-18
Pp.rp28 <sup>c</sup>	G/AT	336	AJ297308	-	↑	(1.55)		↓	(0.69)	EST	BF609293	<i>Pinus taeda</i>	50 / 1e-03
Pp.rp12	CG/AT	290	AJ297306	-	↑	(1.05)		↓	(0.58)	no hit			
Pp.rp30	GT/GT	274	AJ297309	-	↓	(0.68)	S.	↓	(0.86)	no hit			

\*Selective bases of each Pst and Mse primer enzyme combination. +: Presence, -: Absence, -: Induction, †: Repression. Ratios of expression levels between the control and stress conditions are given in parenthesis. \*\* S. = Significant (P<0.05).

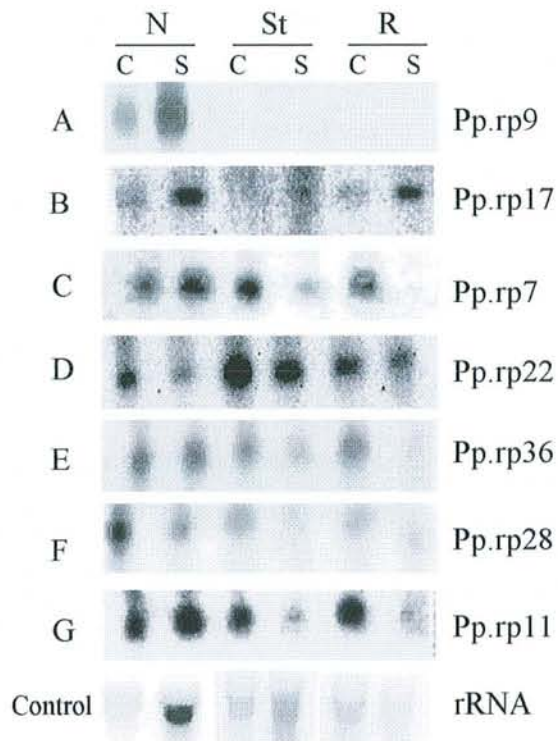
- a): Match to the maritime pine EST database: - Pp.rp9 (527bp) hit with *Lycopersicon esculentum* glycolate oxidase (score/Evalue: 120 / 1e-26)  
 - Pp.rp17 (633bp) hit with *Arabidopsis thaliana* oxylase like protein (score/Evalue: 226 / 3e-58)  
 - Pp.rp22 (682bp) hit with *Arabidopsis thaliana* histone H2B (score/Evalue: 167 / 1e-40)
- b): 3'-RACE: Match to the non redundant database: - Pp.rp2 (948bp) hit with *Pinus radiata* caffeic acid ortho-methyltransferase (score/Evalue: 136 / 6e-44)  
 - Pp.rp23 (989bp) hit with *Hordeum vulgare* formate dehydrogenase (score/Evalue: 342 / e-108)
- c): Northern available  
 d): RT-PCR available

such a contradiction with the result of the reverse northern, it must be recalled that one of the most intriguing findings from recent genomic and EST sequencing projects is the omnipresence of large gene families in plant genomes. This observation particularly applies for conifers, whose genes are organized in complex families [40]. Therefore, it is possible that different members of the NAD-dependent formate dehydrogenase cross-hybridized by reverse northern and amplified by RT-PCR. The same hypothesis could be advanced for Pp.rp21 (cell division protein FtsH). Although no validation was performed for this clone, its small size (122 bp) constituted an additional argument to reinforce the cross-hybridization hypothesis.

The statistical design used to analyse the spot intensity makes it possible to account for experimental variations and precisely measured the relative abundance of each transcript. A total of 16 genes were significantly affected by the stress and confirmed the cDNA-AFLP results. Fourteen genes were found to be increased by a factor ranging from 1.59 to 6.74. Among known function genes, the highest differential expression detected were for S-adenosyl-l-homocysteine hydrolase (5.29-fold increase) and glycolate oxidase (4.54). Two clones corresponding to unknown function genes were found to be decreased by a factor of 1.47 (Pp.rp30) and 4.54 (Pp.rp27). A total of 21% of the genes that were pre-screened by cDNA-AFLP showed a least a two-fold variation in transcript abundance. In comparison to large-scale transcript profiling experiments (e.g. 41, 42), this estimate is higher, and underlines the efficiency of the cDNA-AFLP procedure to detect highly differentially expressed genes. Such a result has also been found for other differential display techniques (e.g. SSH vs. mini-arrays, 43). The statistical design also allowed to detect rather small changes that would have remained undetected if the classical  $\pm$  two-fold ratio was used (Figure 2).

Finally, the lack of statistical support for the remaining genes could be attributed to a higher variability in the intensity of the three replicated spots. Since the ANOVA model takes into account the standard deviation within each condition (control and stress), even a notable difference between the two means was not detected as significant: see for example the 1.6 fold-increase of clone Pp.rp6 and the 1.69 fold-decrease of clone Pp.rp8.

The expression pattern of the drought responsive genes detected in roots by cDNA-AFLP, was also studied in aerial part by reverse northern (Figure 2.B). In this tissue, a total of 18 clones (54.5%) displayed significant differences between the control and drought stress conditions, from which 7 and 11 increase or decrease by a factor ranging from 1.15 to 2.46 and 1.37 to 2.44, respectively. Among known function genes, the highest and lowest differential expression were for an ATPase (Pp.rp16, 2.46-fold increase) and a xyloglucan



**Figure 3:** Northern blot analysis of seven transcript levels (Pp.rp7, Pp.rp9, Pp.rp11, Pp.rp17, Pp.rp22, Pp.rp28, Pp.rp36) in needles (N), stem (St) and roots (R), in both the control (C) and stress (S) conditions. rRNA was used as a control. Northern blot for clones Pp.rp9, Pp.rp7, Pp.rp22 and Pp.rp36 were revealed after two days of exposition, and 10 days for clones Pp.rp11, Pp.rp17 and Pp.rp28.



endotransglycosylase (Pp.rp26, 2.44-fold decrease). Among unknown function genes, clones were found to increase or decrease by a factor of up to 1.47 (Pp.rp31) and down to 1.92 (Pp.rp25), respectively.

Most of the clones (76%) presented a similar pattern of expression between both conditions in root and aerial part. However, although the nature of variation appears to be conserved between both tissues the degree of variation remain closely linked to each tissues. Interestingly, some clones presented an opposite behavior between root and aerial part suggesting a tissue specific regulation of the corresponding genes (e.g. Pp.rp19, Pp.rp24, Pp.rp25 and Pp.rp26).

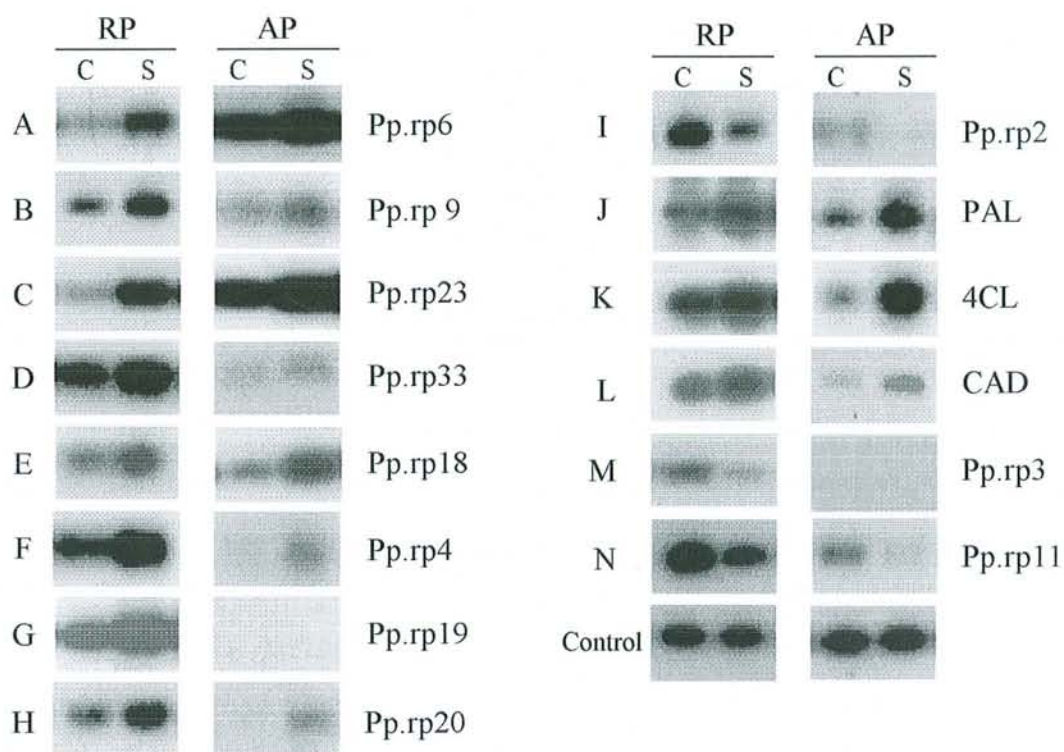
## Discussion

The cDNA AFLP technique is an attractive alternative to the conventional differential screening of cDNA libraries. It has been used to identify a wide-range of candidate genes that may have roles in potato tuber development [24], flower pigmentation [29], nematode development [28], plant defence response [44] and fruit ripening processes [45]. In the present study, we isolated 33 cDNA tags putatively involved in drought stress response in maritime pine roots, and validated their expression pattern by reverse northern. The putative roles of the proteins encoded are consistent with biochemical processes known to occur during this abiotic stress (described below). Other genes identified encoded polypeptides with no significant level of similarity to any other genes in the databases or showed high similarity to unknown *Arabidopsis thaliana* or *Pinus taeda* EST.

### Up-regulated genes

-clone Pp.rp1 is similar to NAD dependent aldehyde dehydrogenase. More precisely, with this clone a hit was obtained with class-3 aldehyde dehydrogenase (EC 1.2.1.3), an important enzyme in the metabolism of lipid peroxidation products. When plants face drought stress, a decrease in leaf water content and stomatal closure induces a decrease in CO<sub>2</sub> availability and the production of oxygen species such as superoxide radicals which alter membranes by lipid peroxidation [46]. Lipid peroxidation induces an increase in cytotoxic and cytostatic aldehydes which are inhibited by class-3 aldehyde dehydrogenase [47].

-Pp.rp6 was identical to a *Pinus taeda* EST (pLP3, accession AI813225) described as being water-deficit inducible in the roots of one year old seedlings raised in a ground medium [48].



**Figure 4:** RT-PCR analysis of fourteen mRNA levels in the root parts (RP) and the aerial parts (AP, needles and stem), in both the control (C) and stress (S) conditions. In the RP, 15 PCR cycles were used for clones Pp.rp2, Pp.rp3, Pp.rp6, Pp.rp9, Pp.rp18, Pp.rp20, Pp.rp23, Pp.rp33, and 20 cycles for clones Pp.rp4, Pp.rp11, Pp.rp19, PAL, 4CL and CAD. In the AP, 15 PCR cycles were used for clones Pp.rp11, PAL, 4CL, CAD, and 20 cycles for clones Pp.rp2, Pp.rp3, Pp.rp4, Pp.rp6, Pp.rp9, Pp.rp18, Pp.rp19, Pp.rp20, Pp.rp23, Pp.rp33. Ubiquitin was used as a control for each clone after 15 cycles of PCR amplification.

Using RT-PCR, this transcript was confirmed as being increased in the PEG medium, in both the root and aerial part (Figure 4.A). pLP3 is a small gene family presenting similarity to ABA stress and ripening genes [49].

-clone Pp.rp9 corresponded to glycolate oxidase (EC 1.1.3.16). The 216bp of this TDF matched perfectly within a maritime pine EST of 527bp. The BLAST-X result of this sequence confirmed the function of our TDF. Using northern analysis, this gene was only detected in needles, being over-expressed under stressed conditions (Figure 3.A). However, when RT-PCR was used, the transcript was shown to be present in roots, also being over-expressed under stressed conditions (figure 4.B). This result may indicate that glycolate oxidase is expressed at a rather low levels in roots. Remarkably, the cDNA-AFLP technique made it possible to detect genes expressed at such low levels. The increase in photorespiratory activity in drought stressed plants was shown to induce glycolate oxidase activity [50]. This enzyme is involved in transforming of glycolic acid into glycolate by adding O<sub>2</sub> and also results in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production. Interestingly, heat stress resistant cucumber genotypes showed a lower rate of respiration and also lower glycolate oxydase activity compared to sensitive genotypes [51]. The potential use of this gene as diagnosing of tolerant pine seedlings will require further experiments.

-clone Pp.rp16 corresponded to an ATPase from *Arabidopsis thaliana*. Various ATPase have been shown to be modulated during development and/or stress. Transcript accumulation of plasma membrane and tonoplast H<sup>+</sup>-ATPase was reported in soybean root subjected to drought stress [52].

-clone Pp.rp17 corresponded to an *Arabidopsis* oxylase-like protein. The 399bp of this TDF matched perfectly within a maritime pine EST of 701bp. The BLAST-X result of this sequence confirmed the function of our TDF. Interestingly, the second hit matched (33% identity and 48% similarity) a member of the *Arabidopsis* SRG1 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase superfamily (ACC oxidase, accession number S44261) involved in ethylene biosynthesis. Both ACC oxidase and ACC synthase (ethylene biosynthesis genes) were reported as being increased in water-stressed roots [10]. Northern analysis validated the differential expression of Pp.rp17 (Figure 3.B). This result confirms the involvement of ethylene in the drought stress response. This hormone is well known to play a role in signal transduction to the rest of the plant.

-clone Pp.rp18 (293bp) corresponded to a putative serine/threonine protein kinase. Although serine/threonine protein kinase were already described as involved in drought stress response during dehydration or high salinity, the function of these kinases remain not well defined [53].

However, Mikolajczyk et al [54] propose that serine/threonine protein kinase may be involved in stress signal transduction in plants. The increased expression of this clone was validated by RT-PCR in root and aerial part (Figure 4.E).

-clone Pp.rp23 (226bp) corresponded to NAD-dependent formate dehydrogenase 1A (EC 1.2.1.2). A longer sequence toward the 3'end was obtained by 3'-RACE cloning. The size of the resulting clone was 989bp and confirmed the function of our TDF. RT-PCR showed that this gene was expressed in both the root and the aerial part, being increased under stressed conditions (Figure 4.C). Its decrease in reverse northern has already been discussed in the result section. Although, the function of NAD-dependent formate dehydrogenase is not well understood in plant cells, it was shown in potato that its expression was higher in non-photosynthetic tissue and enhanced under dark, wounding, hypoxia, cold and drought conditions [55].

-clone Pp.rp26 corresponded to a xyloglucan endotransglycosylase type 1 (XET1). XETs internally cleave xyloglucan polymers (the main component of hemicellulose) and ligate the newly generated reducing end to another xyloglucan chain. By modifying this major cell wall component, Braam et al. [56] hypothesized that they may play an important function in altering wall properties (e.g. extensibility) in response to abiotic stress. Different *Arabidopsis thaliana* XETs have previously been isolated and were shown to be regulated by different stimuli such as touch, darkness, heat shock, cold shock, and also auxin and brassinosteroid application [57].

-clone Pp.rp33 corresponded to a S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase (SHH), a key enzyme in the activated methyl cycle that hydrolyzes S-adenosyl-L-homocysteine in adenosine and homocysteine. Kawalleck et al [58] reported, an increased levels of SAM synthetase and SHH mRNAs in parsley treated with fungal elicitor. Chang et al. [48] showed that SAM synthetase (another enzyme of the activated methyl cycle) was increased in root, stem and needle of *Pinus taeda* water-stress seedlings. In our experiment, RT-PCR confirmed the increased expression of SHH in maritime pine root and aerial parts (Figure 4.D). These results suggest a close metabolic link between abiotic and biotic stress response and an increased turnover of activated methyl groups.

-clone Pp.rp35 corresponded to a putative RAS-related protein, a G-protein involved in the cellular organisation through the vesicle trafficking [38].

-Among the 10 unknown function genes identified as being increased by cDNA-AFLP, four corresponded to *A. thaliana* hypothetical proteins, one to a *Pinus taeda* EST and five did not

match any sequences in the public databases. From these clones, three were tested and validated by RT-PCR: Pp.rp4, Pp.rp19 and Pp.rp20 (figure 4.F, G, H).

#### Down-regulated genes

The response to drought also involves the downregulation of genes. In a previous study, Costa et al. [6] reported the decrease in protein quantity for photosynthetic genes in needles. In this study, other genes were found to be under expressed in the roots:

-clone Pp.rp2 was similar to the caffeic acid ortho-methyl transferase enzyme (COMT, EC2.1.1.6), which catalyzes, in the gymnosperm species, the methylation of caffeic acid in ferrulate, using S-adenosyl methionine as the methyl group donor for the biosynthesis of guaiacyl lignin [59]. A longer sequence toward the 3'end was obtained by 3'-RACE cloning. The resulting clone was 948bp and confirmed the function of this TDF. Activation of lignification genes resulting in a higher lignin content has been reported for various types of stresses [60] including drought in pine [6]. However, in our experiment, clone Pp.rp2 was highly repressed under stress condition (Figure 4.I). This surprising result led us to check the behavior of other lignification genes (PAL: phenyl ammonia lyase EC 4.3.1.5; 4CL: 4-coumarate CoA ligase EC 6.2.1.12; and CAD: cinnamyl alcohol dehydrogenase EC 1.1.1.195). RT-PCR showed that these three genes were over-expressed in drought conditions (Figures 4.J, K, L). Although it was not measured, these observations may suggest that drought could induce a shift in monolignol composition, by either increasing the synthesis of para-hydroxyphenyl residue (H unit) or increasing the production of guaiacyl residue (G unit) via the caffeate which is conjugated with coenzyme-A by 4CL to form an activated thioester precursor: caffeoyl-CoA. Caffeoyl-CoA methylation can be carried out by caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase (CCoA-OMT) to produce feruloyl-CoA, transformed in coniferyl alcohol by successive reduction (cinnamoyl-CoA reductase: CCR) and dehydrogenation (CAD).

-clone Pp.rp3 corresponded to a putative RING zinc finger protein of *Arabidopsis thaliana*. RT-PCR confirmed that the level of Pp.rp3 was decreased in roots (Figure 4.M). No signal was obtained in the aerial part. Various transcription factors have already been shown to be regulated by abiotic stresses [61]. Again, the cDNA-AFLP technique made it possible to isolate a transcript expressed at low level.

-clone Pp.rp7 was similar to the preprotein translocase SecA. This gene product is a member of the Sec protein family and acts as a protein carrier through the stroma to the thylakoid (reviewed in 62). Using *in vitro* analysis, Nohara et al. [63] and Haward et al. [64] showed that this protein could carry the 33-kDa protein oxygen evolving complex (OE33) or

plastocyanine (PC) to the thylakoid. Using the mutant *thal* of maize, Voelker et al. [65] showed that *in vivo* cp-SecA plays a role in targeting the chloroplast-encoded protein (OE33, PC, and cytochrome f), and in protein targeting in the etioplast (a non-photosynthetic plastid type). This mutation appears to be seedling-lethal, showing the preponderant involvement of this protein in photosynthesis. In our study, northern analysis confirmed a messenger decrease in stressed needle, stem and root (Figure 3.C) which could be attributed to a decrease in the photosynthesis rate. To our knowledge, no report has reported the down regulation of this gene under abiotic or biotic stresses or its presence in root.

-clone Pp.rp21 corresponded to the cell division protein FtsH of *Arabidopsis thaliana*. FtsH is membrane localized and has an activity corresponding to an ATP-dependent zinc metalloprotease [66]. This protein can also act as a chaperone functioning in diverse membrane-associated events, such as protein insertion into membranes, disassembly or oligomerization of protein complexes [67]. FtsH was also reported as being involved in protein translocation with Sec family genes [68], that were previously described as decreased genes. Surprisingly the cDNA-AFLP and the reverse northern gave opposite results in respect to its expression pattern (see comments in the result section).

-clone Pp.rp22 was similar to histone H2B. The 362bp of this TDF matched perfectly within a maritime pine EST of 682bp. The BLAST-X result of this sequence confirmed the function of our TDF. Accumulation of histone H2B transcripts was found in organs containing meristematic tissue and/or with a high proportion of actively cycling cells [69]. In our study, histone H2B presented ubiquitous expression among the different plant tissues and was under-expressed in stressed root, stem and needle after three weeks of treatment (Figure 3.D), indicating a decrease in cell division activity in the root meristems.

-clone Pp.rp36 was similar to a member of the hydrophobic LEA (late embryogenesis abundant protein) gene family. Northern analysis confirmed that this gene decreased in the root and stem of drought-stressed seedlings, whereas no difference was observed in needle (Figure 4.E). In yeast, hydrophobic LEA (HSP12) showed increased expression during osmotic stress [70]. In tomato, another type of hydrophobic LEA (ER5) was described as being increased in drought conditions [71]. The decrease in the mRNA level of Pp.rp36 tends to show that this gene is more related to the growth inhibition of the root system after three weeks of stress rather than regulated by the stress itself.

-Seven unknown function genes were also identified by cDNA-AFLP as being repressed, among which three corresponded to *Arabidopsis thaliana* hypothetical proteins, two to *Pinus taeda* EST and two presented no hit on public databases. Clone Pp.rp28 was validated by

northern analysis (Figure 3.F) and Pp.rp11 by both northern and RT-PCR analysis (Figure 3.G and 4.N).

## Conclusion

Roots constitute the primary site of drought perception. In most studies, imposition of drought stress is rapid ranging from few hours (e.g. 72, 42) to only few days (e.g. 73). Such a short stress duration is well adapted to investigate the short-term response of the plants, and is particularly relevant in the case of annual crops. Changes in gene expression leading to the synthesis and activation of novel proteins have been well documented in crop plants [74] and model organisms such as *Arabidopsis thaliana* [42] and *Craterostigma plantagineum* [41]. However, very little is known about the biochemical and molecular mechanisms involved in drought tolerance in forest trees, especially in gymnosperm. Trees develop an important root system to anchor their stem (that can reach hundreds of feet) and prospect the soil for water and nutrients. In certain areas, such as in the Aquitaine region where maritime pine is growing, these long-lived organisms face prolonged drought periods. In such harsh conditions, mid- to long-term adaptation is of primary importance if major losses are to be avoided. With the aim of studying the mid-term molecular response in a conifer species, we focus our analysis on a well-established stress after 21 days of water deficit. Although widely used and accepted, the molecular mechanisms that were put in place in hydroponically grown seedlings will have to be validated on seedlings growing under field conditions.

The non radioactive cDNA-AFLP offered a fast, sensitive and reliable procedure to isolate differentially expressed genes. The high percentage of transcripts for which the accumulation was found to be drought-regulated, demonstrated the utility of the cDNA-AFLP in determining the major changes taking place during drought adaptation. Except for very few cases, reverse northern, northern and RT-PCR confirmed the result of the cDNA-AFLP experiment. However, these three verification procedures did not validate the qualitative variation observed by this method, showing that none of the investigated gene was specifically expressed in the well-watered or the drought stress condition.

This experiment allowed for the first time to clone and sequence several genes that are enhanced or repressed during drought stress in maritime pine roots. They belonged essentially to four categories: (i) water deficit induced inhibition of growth processes (e.g. histone, FtsH cell division protein), (ii) cellular changes resulting from metabolic impact of stomatal

closure, reduced transpiration and photosynthesis (e.g. aldehyde dehydrogenase, glycolate oxidase, ATPase, NAD-dependent formate dehydrogenase, S-adenosyl-l-homocysteine hydrolase, translocase SecA, hydrophobic LEA), (iii) cellular changes that enhance dehydration tolerance (e.g. pLP3, lignification, XET) and (iv) regulatory elements (e.g. serine/threonine protein kinase, RAS-related protein, ring zinc finger protein) or plant hormone biosynthesis (e.g. oxylase like protein). Sequences presenting no hit on public databases were also identified. Three of them displayed  $\geq 2.5$ -fold differential expression between the control and drought stressed roots. Transgenic plants containing over-expression or antisense constructs for these genes could be generated in pine or the model plant species *Arabidopsis* to gain more functional informations. The isolated genes provide interesting functional and expressional candidate genes that can serve as molecular markers for identifying quantitative trait loci (QTL). QTLs for stomatal conductance, maximum photosynthesis, carbon isotope discrimination, predawn water potential, relative water content, osmotic potential, and transpiration have already been localized in the genetic map of maritime pine (6; O. Brendel unpublished). Comparison between the map location of candidate genes and the QTLs will provide us with new insights into the underlying mechanisms by which trees respond to drought stress.

#### ACKNOWLEDGMENTS

CD is supported by a fellowship from the Ministère de la Recherche et de la Technologie. We acknowledge fundings from the European Union (INCO-IC18-CT97-0200), Région Aquitaine (CCRRDT n°20000307007) and INRA (ECOGENE and LIGNOME).



## REFERENCES

1. Parry ML (2000) Assessment of potential effects and adaptations for climate change in Europe: summary and conclusions. Jackson Environment Institute, University of East Anglia, Norwich, UK, 24pp.
2. Guyon JP and Kremer A. 1982. Stabilité phénotypique de la croissance en hauteur et cinétique journalière de pression de sève et de la transpiration chez le pin maritime (*Pinus pinaster* Ait.), Can. J. For. Res. 12: 936-946.
3. Nguyen-Querens A, Ferhi A, Loustau D, Guehl JM. 1998. Within  $\delta^{13}\text{C}$  spatial variability and interannual variations in wood cellulose of two contrasting provenances of *Pinus pinaster*. Can. J. For. Res. 28: 766-773.
4. Nguyen A, Lamant A. 1988. Pinitol and myo-inositol accumulation in water-stressed seedlings of maritime pine. Phytochemistry. 27: 3423-3427.
5. Nguyen A, Lamant A. 1989. Variation in growth and osmotic regulation of roots of water-stressed maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.) provenances. Tree Physiol. 5: 123-133.
6. Costa P, Bahrman N, Frigerio J-M, Kremer A, Plomion C. 1998. Water-deficit-responsive proteins in maritime pine. Plant Molecular Biology. 38: 587-596.
7. Costa P. 1999. Réponse moléculaire, physiologique et génétique du pin maritime à une contrainte hydrique. PhD thesis, Université Henry Poincaré, France. 116p.
8. Champoux MC, Wang G, Sarkarung S, Mackill DJ, O'Toole CO, Huang N, McCouch SR. 1995. Locating genes associated with root morphology and drought avoidance in rice via linkage to molecular markers. Theor. Appl. Genet. 90: 969-981.
9. Price AH, Steele KA, Moore BJ, Barraclough PB, Clark LJ. 2000. A combined RFLP and AFLP linkage map of upland rice (*Oryza sativa* L.) used to identify QTLs for root-penetration ability. Theor. Appl. Genet. 100: 49-56.
10. Tudela D, Primo-Millo E. 1992. 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid transported from roots to shoots promotes leaf abscission in Cleopatra mandarin (*Citrus reshni* Hort. Ex Tan.) seedlings rehydrated after water stress. Plant Physiology. 100: 131-137.
11. Montero E, Cabot C, Poschenrieder CH, Barcelo J. 1998. Relative importance of osmotic-stress and ion-specific effects on ABA-mediated inhibition of leaf expansion growth in *Phaseolus vulgaris*. Plant, Cell and Environment. 21: 54-62.
12. Liotenberg S, North H, Marion-Poll A. 1999. Molecular biology and regulation of abscisic acid biosynthesis in plants. Plant Physiology and Biochemistry. 37: 341-350.

13. McCully ME. 1999. Roots in soil: unearthing the complexities of roots and their rhizospheres. *Annu. Rev. Plant. Mol. Biol.* 50: 695-718.
14. Büssis D, Kauder F, Heineke D. 1998. Acclimation of potato plants to polyethylene glycol-induced water deficit I. Photosynthesis and metabolism. *J. Exp. Botany.* 49: 1349-1360.
15. Aziz A and Larher. 1998. Osmotic stress induced changes in lipid composition and peroxidation in leaf discs of *Brassica napus* L. *J. Plant. Physiol.* 153: 754-762.
16. Leone A, Costa A, Tucci M, Grillo S. 1994. Comparative analysis of short- and long-term changes in gene expression caused by low water potential in potato (*Solanum tuberosum*) cell-suspension cultures. *Plant. Physiol.* 106: 703-712.
17. Liang P, Pardee AB. 1992. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 257: 967-971.
18. Hubank M, Schatz DG. 1994. Identifying differences in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA. *Nucleic Acids Res.* 22: 5640-5648.
19. Velculescu VE, Zhang L, Vogelstein B, Kinzler KW. 1995. Serial analysis of gene expression. *Science* 270: 484-487.
20. Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. 1995. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270:467-470.
21. Desprez T, Amselem J, Caboche M, Höfte H. 1998. Differential gene expression in *Arabidopsis* monitored using cDNA arrays. *Plant J* 14: 643-652.
22. Piétu G, Mariage-Samson R, Fayein N, Matigou C, Eveno E, Houlgatte R, Decraene C, Vandenbrouck Y, Tahi F, Devignes M, Wirkner U, Ansorge W, Cox D, Nagase T, Nomura N, Auffray C. 1999. The Genexpress IMAGE knowledge base of the human brain transcriptome: A prototype integrated resource for functional and computational genomics. *Genome Res.* 9: 195-209.
23. Diatchenko LD, Lau Y, Campbell AP, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, Lukyanov S, Gurskaya N, Sverdlov ED, Siebert PD. 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.
24. Bachem CWB, Van der Hoeven RS, de Bruijn SM, Vreugdenhil D, Zabeau M, Visser RGF. 1996. Visualisation of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: Analysis of gene expression during potato tuber development. *Plant J* 9: 745-753.

25. Shoko K, Tadashi O, Hiroko K, Osamu C, Kousaku O. 1999. Expression profiling by iAFLP: A PCR-based method for genome-wide gene expression profiling. *Genome Res* 9: 1305-1312.
26. Xu, N., Johns, B., Pullman, G.S., and Cairney, J. 1997. Rapid and reliable differential display from minute amounts of tissue : Mass cloning and characterization of differentially expressed genes from loblolly pine embryos. *Plant Mol. Biol. Rep.* 15: 377-391.
27. Zegzouti, H., Marty, C., Jones, B., Bouquin, T., Latché, A., Pech, J., and Bouzayen, M. 1997. Improved Screening of cDNA generated by mRNA differential display enables the selection of true positives and the isolation of weakly expressed messages. *Plant Mol. Biol. Rep.* 15: 238-245.
28. Jones JT, Harrower, BE. 1998. A comparison of the efficiency of differential display and cDNA-AFLPs as tools for the isolation of differentially expressed parasite genes. *Fundam. appl. Nematol.* 21:81-88.
29. Habu Y, Fukada-Tanaka S, Hisatomi Y, Iida S. 1997. Amplified restriction fragment length polymorphism-based mRNA fingerprinting using a single restriction enzyme that recognizes a 4-bp sequence. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 234: 516-521.
30. Seillac. 1960. Contribution à l'étude de la nutrition du pin maritime : variation saisonnières de la teneur des pseudophylles en azote, potassium et acide phosphorique. PhD thesis, Université de Bordeaux, France.
31. Wang SX, Hunter W, Plant A. 2000. Isolation and purification of functional total RNA from woody branches and needles of sitka and white spruce. *BioTechniques* 28: 292-296.
32. Chang, S., Puryear, J., Cairney, J. 1993. A simple and efficient method for Isolating RNA from pine trees. *Plant Mol. Biol. Rep.* 11: 113-116.
33. Plomion C, Hurme P, Frigerio J-M, Ridolphi M, Pot D, Pionneau C, Avila C, Gallardo F, David H, Neutlings G, Campbell M, Canovas FM, Savolainen O, Bodénès C, Kremer A. 1999. Developing SSCP markers in two *Pinus* species. *Mol. Breed.* 5: 21-31
34. Dellagi A, Birch PRJ, Heilbronn J, Lyon GD, Toth IK. 2000. cDNA-AFLP analysis of differential gene expression in the prokaryotic plant pathogen *Erwinia carotovora*. *Microbiology* 146: 165-171.

35. Bassam BJ, Caetano-Anolles G, Gresshoff PM. 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 196: 80-83.
36. Chalhoub, B.A., Thibault, S., Laucou, V., Rameau, C., Höfte, H., and Cousin, R. 1997. Silver staining and recovery of AFLP amplification products on large denaturing polyacrylamide gel. *BioTechniques* 22: 216-220.
37. Sambrook J, Fritsh EF, Maniatis T. 1989. *Molecular cloning a laboratory manual*. Small-scale preparation of plasmid DNA. 1: 25-28.
38. The Arabidopsis Genome Initiative. 2000. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408: 796-815.
39. Rychlik, W. 1995. Priming efficiency in PCR. *BioTechniques* 18: 84-89
40. Kinlaw, C.S., Neale D.B. 1997. Complex gene families in pine genomes. *Trends Plant Sci.* 2: 356-359.
41. Cushman, J.C., Bohnert, H.J. 2000. Genomic approaches to plant stress tolerance. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3: 117-124.
42. Seki, M, Narusaka, M, Abe, H, Kasuga, M, Yamaguchi-Shinozaki, K, Carninci, P, Hayashizaki, Y, Shinozaki, K. 2001. Monitoring the expression pattern of 1300 *Arabidopsis* genes under drought and cold stresses by using a full-length cDNA microarray. *The Plant Cell.* 13: 61-72.
43. Voiblet, C, Duplessis, S, Encelot, N, Martin, F. 2000. Identification of symbiosis-regulated genes in *Eucalyptus globulus-Pisolithus tinctorius* ectomycorrhiza by differential hybridization of arrayed cDNAs. *Plant J.* 25: 181-191.
44. Durrant WE, Rowland O, Piedras P, Hammond-Kosack KE, Jones JDG. 2000. cDNA-AFLP reveals a striking overlap in race-specific resistance and wound response gene expression profiles. *The Plant Cell.* 12: 963-977.
45. Jones CS, Davies HV, Taylor MA. 2000. Profiling of changes in gene expression during raspberry (*Rubus idaeus*) fruit ripening by application of RNA fingerprinting techniques. *Planta.* 211: 708-714.
46. Sgherri CLM, Pinzino C, Navarri-Izzo F. 1993. Chemical changes and O<sub>2</sub>- production in thylakoid membranes under water stress. *Physiol Plant* 87: 211-16.
47. Canuto RA, Muzio G, Ferro M, Maggiora M, Federa R, Bassi AM, Lindahl R, Dianzani MU. 1999. Inhibition of class-3 aldehyde dhydrogenase and cell growth restored lipid peroxidation in hepatoma cell lines. *Free Radical Biology and Medicine.* 26: 333-340.

48. Chang, S., Puryear, J.D., Dias MADL, funkhouer EA, Newton RJ, Cairney, J. 1995. Gene expression under water deficit in loblolly pine (*Pinus taeda* L.): isolation and characterization of cDNA clones. *Physiologia Plantarum*. 97:139-148.
49. Padmanabhan, V., Dias, D.M.A.L., Newton, R.J. 1997. Expression analysis of a gene family in loblolly pine (*Pinus taeda* L.) induced by water deficit stress. *Plant. Mol. Biol.* 35: 801-807.
50. Mittler, R., Zilinskas, B.A., 1994. Regulation of pea cytosolic ascorbate peroxidase and other antioxidant enzymes during the progression of drought stress and following recovery from drought. *Plant. J.* 5: 397-405.
51. Zhou, L.J., Ye, C.L. 1999. Effect of high temperature stress on metabolism of nitrogen and carbohydrates in seedlings of cucumber. *J. of Fujian Agricultural University*. 28: 3, 289-293.
52. Surowy TK and Boyer JS. 1991. Low water potentials affect expression of genes encoding vegetative storage proteins and plasma membrane proton ATPase in soybean. *Plant Mol Biol* 16: 252-62.
53. Yoon, H.W., Kim, M.C., Shin, P.G., Kim, J.S., Lee, S.Y., Hwang, I, , Bahk, J.D., Hong, J.C., Han, C, Cho, M.J. 1997. Differential expression of two functional serine/threonine protein kinases from soybean that have an unusual acidic domain at the carboxy terminus. *Mol. Gen. Genet* 255: 359-371.
54. Mikolajczyk, M, Awotunde, O. S., Muszynska, G, Klessig, D. F., Dobrowolska, G. 2000. Osmotic stress induces rapid activation of a salicylic acid-induced protein kinase and a homolog of protein kinase ASK1 in tobacco cells. *Plant Cell* 12: 165-178.
55. Hourton-Cabassa C, Ambart-Bretteville F, Moreau F, Davy de Virville J, Rémy R, Colas des Francs-Small C. 1998. Stress induction of mitochondrial formate dehydrogenase in potato leaves. *Plant Physiology*. 116: 627-635.
56. Braam J, Sistrunk ML, Polisensky DH, Xu W, Purugganan MM, Antosiewicz DM, Campbell P, Johnson KA. 1997. Plant responses to environmental stress: regulation and functions of the Arabidopsis TCH genes. *Planta* 203: S35-S41.
57. Xu W, Campbell P, Vargeese AK, Braam J. 1996. The Arabidopsis XET-related gene family : environmental and hormonal regulation of expression. *Plant J.* 9: 879-889.
58. Kawalleck P, Plesch G, Hahlbrock K, Somssich IE. 1992. Induction by fungal elicitor of S-adenosyl-L-methionine synthase and S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase mRNAs in cultured cells and leaves of *Petroselinum crispum*. *Proc. Natl. Acad. Svi. USA.* 89: 4713-4717.

59. Whetten R, Sederoff R. 1995. Lignin biosynthesis. *The Plant Cell*. 7: 1001-1013.
60. Dixon R, Paiva NL. 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *The plant cell*. 7: 1085-1097.
61. Ito K, Kusano T, Tsutsumi K. 1999. A cold inducible bZIP protein gene in radish root regulated by calcium- and cycloheximide-mediated signals. *Plant Sci* 142: 57-65.
62. Keegstra K, Cline K. 1999. Protein import and routing systems of chloroplasts. *The Plant Cell*. 11: 557-570.
63. Nohara T, Nakai M, Goto A, Endo T. 1995. Isolation and characterization of the cDNA of pea chloroplast SecA. Evolutionary conservation of the bacterial-type SecA-dependent protein transport within chloroplasts. *FEBS letters*. 364: 305-308.
64. Haward, S.R., Napier, J.A., Gray, J.C. 1997. Chloroplast SecA function as a membrane-associated component of the Sec-like protein translocase of pea chloroplasts. 248: 724-730.
65. Voelker R, Mendel-Hartvig J, Barkan A. 1997. Transposon-disruption of a maize nuclear gene, *tha 1*, encoding a chloroplast SecA homologue: *in-vivo* role of cp-SecA in thylakoid protein targeting. *Genetics*. 145: 467-478.
66. Ostersetzer O, Adam Z. 1997. Light-stimulated degradation of an unassembled rieske FeS protein by a thylakoid-bound protease: the possible role of FtsH protease. *Plant Cell*. 9: 957-965.
67. Suzuki CK, Rep M, Van Dijl JM, Suda K, Grivell LA, Schatz G. 1997. ATP-dependant proteases that also chaperone protein biogenesis. *Trends in Biochemical Sciences*. 22 : 118-123.
68. Douville K, Price A, Eichler J, Economou A, Wickner W. 1995. SecYEG and SecA are the stoichiometric components of preprotein translocase. *Journal of Biological Chemistry*. 270: 20106-20111.
69. Van Den Heuvel KJ, Van Exch RJ, Barendse GW, Wullems GJ. 1999. Isolation and molecular characterization of gibberellin-regulated H1 and H2B histone cDNAs in the leaf of the gibberellin-deficient tomato. *Plant Molecular Biology*. 39: 883-890.
70. Sales, K., Brandt, W., Rumbak, E., Lindsey, G. 2000. The LEA-like protein HSP 12 in *Saccharomyces cerevisiae* has a membrane location and protect membranes against desiccation and ethanol-induced stress. *Bioch. Biophys. Acta*. 1463: 267-278.
71. Zegzouti, H., Jones, B., Marty, C., Lelièvre, J-M., Latché, A., Pech, J., and Bouzayen, M. 1997. ER5, a tomato cDNA encoding an ethylene-responsive LEA-like protein:

characterization and expression in response to drought, ABA and wounding. *Plant. Mol. Biol.* 35: 847-854.

72. Peng, Z, Lu, Q, Verma, D.P.S. 1996. Reciprocal regulation of  $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase and proline dehydrogenase genes controls proline levels during and after osmotic stress in plants. *Mol. Gen. Genet.* 253: 334-341.
73. Ishitani, M, Nakamura, T, Han, S.Y., Takabe, T. 1995. Expression of the betaine aldehyde dehydrogenase gene in barley in response to osmotic stress and abscisic acid. *Plant. Mol. Biol.* 27: 307-315.
74. Riccardi, F, Gazeau, P, de Vienne, D, Zivy, M.1998. Protein changes in response to progressive water deficit in maize. *Plant Physiol* 117: 1253-1263.

## Publication 2

Les végétaux font constamment face à des agressions biotiques et abiotiques qui limitent leur développement. De par leur longévité, les arbres forestiers sont particulièrement soumis à ces contraintes de croissance qui peuvent limiter à terme la production de bois. Les prédictions des climatologues sur les changements globaux vont dans le sens d'une amplification de ce phénomène à l'échelle du siècle. Dans le but de créer des variétés résistantes *via* la sélection assistée par marqueurs, nous décrivons ici comment nous avons identifié et caractérisé des gènes dont l'expression est régulée au cours d'un stress hydrique. Le stress a été appliqué sur des jeunes plants de pin maritime poussant en milieu hydroponique en utilisant le PEG 3350. Le profil d'expression des transcrits a été décrit pour un plan factoriel croisant durée et intensité du stress.

Nous avons caractérisé dans un premier temps l'effet du stress sur les taux de chlorophylle a et b, ainsi que sur le contenu en acide linoléique et le degré d'insaturation du MGDG (monogalactosyl diacylglycérol). Dans un second temps, la technique d'ADNc-AFLP a été utilisée afin d'identifier des gènes régulés par le déficit d'alimentation en eau. 4000 ADNc ont été analysés, parmi lesquels 47 (1,2%) montrent une variation de type présence/absence entre les plants de la condition témoin (-0,08MPa) et ceux de la condition stressée (-0,45MPa). 29 et 18 fragments sont respectivement sur- ou sous-exprimés au cours du stress. 53% de ces fragments correspondent à des gènes de fonctions connues pour leur implication dans les mécanismes principaux de la réponse au stress hydrique (photosynthèse, croissance et développement, métabolisme des sucres, synthèse et modification de la paroi, mécanismes de défense). 19% présentent des similarités avec des protéines hypothétiques d'*Arabidopsis thaliana* et 28% correspondent à de nouvelles séquences. L'efficacité de cette technique de criblage différentiel a également été validée par d'autres analyses d'expression (northern, RT-PCR). L'identification de gènes impliqués dans la réponse moléculaire à un déficit d'alimentation en eau constitue la première étape d'une stratégie globale visant à identifier ceux qui sont réellement impliqués dans les mécanismes de tolérance.



**Identification and characterization of water-deficit responsive genes  
in hydroponically grown maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.) seedlings**

CHRISTIAN DUBOS<sup>1</sup>, GREGOIRE LE PROVOST<sup>1</sup>, FRANCK SALIN<sup>2</sup>, CELINE LALANNE<sup>1</sup>, DELPHINE MADUR<sup>1</sup>, JEAN-MARC FRIGERIO<sup>1</sup> and CHRISTOPHE PLOMION<sup>1</sup>.

1/ Equipe de Génétique et Amélioration des Arbres Forestiers, INRA Pierroton, BP 45, 33610 Cestas, France.

2/ Laboratoire de Chimie des Substances Végétales, Institut du Pin, 351, Cours de la libération, 33405 Talence Cedex, France.

Correspondence: C. Plomion

Tel: +33-5-57-97-90-76

Fax:+33-5-57-97-90-88

E-mail: [plomion@pierroton.inra.fr](mailto:plomion@pierroton.inra.fr)

**Soumis** : Plant physiology

## ABSTRACT

Growth, development and productivity of long-lived organisms such as forest trees are continuously challenged by abiotic stresses, and may also be greatly affected by the possibility of rapid climatic changes in the near future. As a first step toward creating resistant maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.) varieties by marker-assisted breeding, we describe the identification and characterization of drought-inducible genes in hydroponically grown seedlings. A factorial design experiment, crossing stress duration with stress intensity (obtained by addition of polyethylene glycol), was used to monitor the biochemical and molecular responses of young seedlings. Drought stressed plants exhibited a significant decrease in chlorophyll a and b contents and an increase in linolenic acid and unsaturated ratio in monogalactosyl diacylglycerol. The cDNA-AFLP technique was used to identify genes regulated by water deprivation. Approximately 4000 transcript derived fragments (TDFs) were screened, of which 48 showed clear “presence/absence” variation between well watered (-0.08MPa) and osmotically stressed (-0.45MPa) conditions. The accumulation of 28 and 20 TDFs were found to increase or decrease in the drought stress medium, respectively. Of these, 64.6% corresponded to known function proteins, indicating the main mechanisms involved in drought stress response in maritime pine (photosynthesis, growth and development, carbohydrate metabolism, cell wall synthesis and plant defence). While 14.6% were similar to *Arabidopsis thaliana* gene products, 10.4% were similar to *Pinus taeda* ESTs and 10.4% presented no hit in public databases. The relative abundance of these transcripts was then quantitatively analysed by reverse northern, in both aerial and root tissues, confirming the effectiveness of the cDNA-AFLP technique in detecting differentially expressed genes. The identification and characterization of water-deficit responsive genes provide us with partial insights into the nature of the machinery involved in drought tolerance in a conifer species.

## INTRODUCTION

Unlike animals, plants cannot avoid unfavorable habitats or sudden changes in the climate or a pathogen attack by moving over long distances to more suitable environments and so, if they are to survive, they have to be able to adapt rapidly to new conditions. Perennial plants such as trees are confronted with environmental changes throughout their life span to an even greater extent. Growth, development and productivity of such long-lived organisms are continuously challenged by abiotic stresses such as freezing, drought, and pollutants, and may also be greatly affected by the possibility of rapid climatic changes in the near future (Hughes, 2000). The maintenance of sufficient growth under stress conditions will therefore require the availability of varieties or natural resources that are adapted to present and future climatic conditions if major losses are to be avoided. At the infra-specific level, the genetic improvement of such characteristics has not yet been considered in forest tree breeding programs, namely due to the complex nature of environmental stress tolerance and the time lag required for a breeding cycle to take place. However, selection for stress adaptation could now benefit from the modern biotechnology tools used in the field of functional genomics (Bouchez and Höfte, 1998). Application of genomic technology to forest trees would be very helpful in accelerating breeding and facilitating the creation of tolerant varieties either by marker-assisted selection or genetic engineering.

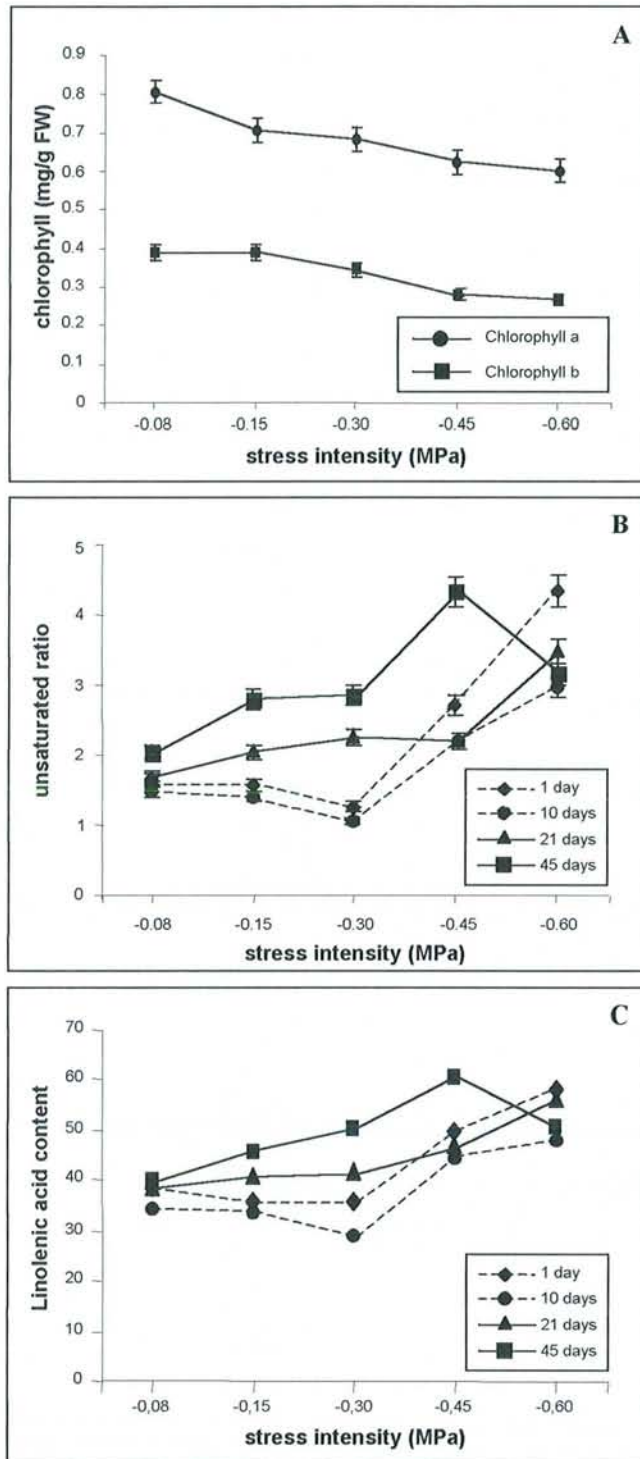
Changes in gene expression leading to the synthesis and activation of novel proteins (Ingram and Bartels, 1996; Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 1996) have been well documented in crop plants (Riccardi et al., 1998), and model organisms such as *Arabidopsis thaliana* and *Craterostigma plantagineum* (Cushman and Bohnert, 2000). However, very little is known about the biochemical and molecular mechanisms involved in drought tolerance in trees, especially in forest trees. Only a few results published for the genus *Pinus* (Chang et al., 1995; Mayne et al., 1996; Padmanabhan et al., 1997; Costa et al., 1998; Dubos and Plomion, 2001a, b) and *Populus* species (Wang et al., 1995; 1997) are available and give us some insights into changes in gene and protein expression associated with drought stress. Given the characteristics of forest trees (long life span, size of such organisms), it is possible that the problems posed by water-deficit stress have been solved by strengthening specific biochemical pathways compared to those of annual plants. If the same genes are likely to be expressed in annual and perennial organisms, it is possible that they differ in the way in which they are regulated. For example few studies in conifers described the involvement of genes/proteins corresponding to *lea* or dehydrin (Jarvis et al., 1996; Richards et al., 2000),

although frequently reported as being linked to drought stress response in annual species. On the other hand, no ABA-responsive (rab) genes were detected in pine so far. In the same line, drought inducible genes that are absent or not expressed in a stress context in crops plants have been well documented for the ice plant *Mesembryanthemum crystallinum* (Vernon and Bonhert, 1992; Nelson et al., 1998).

In this context, we believe that the genetic improvement of tree growth and productivity in drought stressed environments cannot be derived solely from studies of model organisms, but requires an understanding of the molecular mechanisms involved in stress responses and responsible for stress adaptation in trees. This challenge is underway in maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.), the main conifer species used for reforestation in Southwestern Europe where contrasting climatic conditions prevail. In France, where it represents 10% of the forested area, this species often faces severe drought in summer, limiting growth and productivity. To elucidate the molecular processes that determine its adaptability to dry sites, molecular (Costa et al., 1998; Dubos and Plomion, 2001a; b), genetic (Costa, 1999) and physiological (Fernandez et al., 2000) approaches are currently being undertaken.

Although the response to environmental changes encountered by complex organisms such as trees involves the modification of hundreds of genes, those that are actually responsible for most of the genetic variation existing in stress adaptation and/or tolerance might be of a limited number, as shown in quantitative trait loci mapping experiments for numerous quantitative traits (reviewed by Pflieger et al., 2001) including drought stress behaviour (Prioul et al., 1997). One possible strategy for identifying these genes which make essential contributions to stress tolerance is based on the candidate gene approach, where functional (known genes that putatively affect trait expression) or expressional (genes whose expression varies during stress or developmental processes) candidate genes are located on a genetic map and their positions are compared to the positions of relevant QTLs involved in the genetic control of the trait of the interest.

As a first step to this approach, the main objective of this report was to identify and characterize candidate genes involved in drought stress responses in maritime pine seedlings raised in an hydroponic solution. A factorial design experiment, crossing stress duration with stress intensity (obtained by addition of polyethylene glycol), was used to monitor the molecular responses of young seedlings. We used the cDNA-AFLP technique (Bachem et al., 1996) to specifically address the regulation of gene expression at the transcriptional level in



**Figure 1: A):** Variation in chlorophyll a and chlorophyll b content in needles of maritime pine seedlings after 21 days of stress under different stress intensities (-0.08; -0.15; -0.30; -0.45; -0.60 MPa). **B):** Effect of water deprivation on linolenic acid content in needles according to stress intensity (-0.08 to -0.60 MPa) and stress duration (1 to 45 days). **C):** Effect of water deprivation on the unsaturated (16:1,18:1,18:2,18:3) to saturated (16:0,18:0) fatty acid ratio of MGDG fraction according to stress intensity (-0.08 to -0.60MPa) and stress duration (1 to 45 days).

developing needles. Reverse northern was then used to analyse the behaviour of the isolated clones in needles as well as in the roots system of the same plant material.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Biochemical characterization of stress

Water deprivation, like other environmental stresses including cold, salinity or extreme temperatures, induces numerous complex biochemical and physiological responses in plants (Lichtenthaler, 1998). For example, drought stress can induce several events such as the adjustment of stomatal conductance and carbon allocation (Borghetti et al., 1997), modifications in photosynthetic pigments and efficiency of the photochemical photosystem II, resulting in altered plant growth. The production and proportions of metabolically important carbohydrates (sugars, starch and sugar alcohols) can be modified (Volaire and Thomas, 1995) and the fatty acid composition of membrane lipids can also be changed (Zuniga et al., 1990; Maldonado et al., 1997). In order to characterize the stress applied to maritime pine seedlings at the biochemical level, we investigated the modification in the chlorophyll content as well as the linolenic acid contained in MGDG (monogalactosyl diacylglycerol).

#### *Effect of water deprivation on chlorophyll content*

Measurements of chlorophyll content showed that drought induced a 25% and 30 % decrease in chlorophyll a and chlorophyll b, respectively (Fig. 1A). A decrease in chlorophyll content is a commonly reported response of plants facing abiotic stresses (Jagtap et al., 1998; Sutinen et al., 2000) and is linked to the stomatal closure and consecutive photosynthesis decrease. Chlorophyll loss is the consequence of an increased production of superoxide, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and hydroxyl radicals (Asaka, 1996). These active oxygen species are extremely damaging to proteins, pigments and lipids and can lead to chlorophyll degradation, photodamage and lipid photooxidation (Munné-bosch et al., 1999). The decrease of chlorophyll content can also be considered as an adaptive feature in plants grown under stress conditions. It reduces the amount of light intercepted by needles and at the same time reduces the formation of activated oxygen limiting the possibility of further damage to the photosynthetic machinery (Gilmore and Ball, 2000).

#### *Effect of water deprivation on MGDG fatty acid content*

When seedlings of maritime pine were subjected to water deprivation, they reacted by changing their content of one of the main fatty acids of MGDG, i.e. linolenic acid (18:3). Their response depended on two factors: the intensity and the duration of the stress. The same response could be reached by either a short period of stress of moderate intensity, or a longer period of stress with lower intensity. For moderate stresses (-0.08 to -0.30MPa), the 18:3 level slowly decreased or remained unchanged (Fig. 1B) until stress duration exceeded 21 days. Then, at greater stress intensity values (-0.45 to -0.60MPa), seedlings started increasing their level of 18:3, but after 45 days of stress the 18:3 content decreased. These trends were also observed for the unsaturated to saturated ratio of MGDG (Fig. 1C). In contrast, no significant difference in the repartition of phospholipid fatty acids were observed, except for the highest stress value (data not shown).

Galactolipids are the predominant lipids of photosynthetic membranes in plants, algae and a variety of bacteria. In plants, MGDG and DGDG (digalactosyl diacylglycerol) occur exclusively in plastidic membranes, where they account for about 50 and 20 mol percentage of the lipid matrix, respectively (Douce and Joyard, 1996). Up to 80% of all lipids in plants are associated with photosynthetic membranes. MGDG, like DGDG, plays an important role in the physical properties and organization of photosynthetic membranes. Water stress is known to affect its composition (Liljenberg, 1992), especially in polyunsaturated molecular species of galactolipids.

#### *Functional significance of the observed biochemical changes*

Interestingly, the functional significance of such changes can be interpreted by comparison with the behaviour of evergreen species such as pine, holly and sweetgum (Gilmore and Ball, 2000). Photosynthetic efficiency in leaves of evergreens naturally declines to very low levels during winter and remains inhibited until conditions become favorable for growth in spring. These evergreen species maintain significant levels of chlorophyll although a decrease of chlorophyll in the leaf is observed. This mechanism is accompanied by structural arrangements in the thylakoid membranes to store and protect chlorophyll during exposure to high light in winter. Comparatively, in drought stressed pine seedlings, we found an increase of the unsaturated ratio in MGDG that could reflect the maintenance of sufficient amount of chlorophyll, although its content slightly decrease. The presence of a threshold value at -

**Table 1:** Homologies of sequences of AFLP fragments to sequences in the databases. Abbreviations correspond to : P: Photosynthesis; GD: Growth and development; T: Transduction, transcription and translation; CM: Carbohydrate metabolism; OM: Other types of metabolism; CW: Cell wall related genes; D: Plant defense related genes. "+" presence, "-" absence of the AFLP fragment, "↑" increase in intensity, "↓" decrease in intensity in the reverse northern experiment.

Functional category	Clone	Pst/Mse*	Size (bp)	Accession no.	Behavior in needles			Behavior in roots			Homology	Accession no.	Species	BLAST Score / E-value
					cDNA-AFLP	Reverse northern**	S	Reverse northern**	S					
P	Pp.ap30	AG / GT	309	AJ297299	-	↓ (0.44)	S	↓ (0.52)	S	Preprotein translocase precursor (secA)	S65668	<i>Pinus sibirica</i>	192 / 1e-48	
P	Pp.ap3	GT / GA	751	AJ309094	-	↓ (0.50)	S	↓ (0.41)	S	Chlorophyll a/b binding protein type 4 (LHCII)	CAA78901	<i>Pinus palustris</i>	472 / e-132	
P	Pp.ap39	AT / G	363	AJ309119	-	↓ (0.54)	S	↓ (0.36)	S	Chlorophyll a/b binding protein type 1 (LHCI)	Q00984	<i>Pinus palustris</i>	83 / 2e-15	
P	Pp.ap41	AT / C	333	AJ309102	-	↓ (0.45)	S	↓ (0.13)	S	Chlorophyll a/b binding protein type 1 (LHCI)	AAB19040	<i>Pinus palustris</i>	189 / 7e-48	
P	Pp.ap17	G / AC	445	AJ309096	-	↓ (0.67)	S	↓ (0.82)	S	Rubisco small subunit (EC 4.1.1.39)	CAA31774	<i>Pinus thunbergii</i>	211 / 4e-54	
GD	Pp.ap8	GT / CC	193	AJ309121	-	↓ (0.48)	S	↓ (0.54)	S	Gibberellin-regulated protein (GAST1)	AW226116	<i>Pinus taeda</i>	72 / 2e-10	
GD	Pp.ap35	AG / AC	291	AJ309087	+	↓ (0.91)	S	↓ (0.22)	S	Cytokinin-repressed gene (CR9)	BAA06153	<i>Cucumis sativus</i>	61 / 3e-09	
GD	Pp.ap38	AT / AC	317	AJ309101	-	↑ (1.21)	S	↓ (0.75)	S	RNA helicase/RNase III protein (CAF)	AAF03534	<i>Arabidopsis thaliana</i>	47 / 8e-05	
T	Pp.ap29	AG / GT	319	AJ309099	-	↓ (0.60)	S	↓ (0.88)	S	ADP-ribosylation factor (ARF1)	BAA04607	<i>Oryza sativa</i>	96 / 2e-19	
T	Pp.ap21	AG / GA	397	AJ309098	-	↓ (0.39)	S	↑ (1.05)	S	Nucleoside diphosphate kinase III (EC 2.7.4.6)	NDK3_SPIOL	<i>Spinacia oleracea</i>	86 / 2e-34	
T	Pp.ap12	G / CC	525	AJ309112	+	↓ (0.21)	S	↓ (0.52)	S	Putative wall-associated protein kinase (WAK)	AAG50588	<i>Arabidopsis thaliana</i>	59 / 3e-08	
T	Pp.ap19	G / AC	703	AJ309108	+	↑ (1.11)	S	↓ (0.50)	S	Transcription factor (SPT4)	BAB10460	<i>Arabidopsis thaliana</i>	99 / 2e-20	
T	Pp.ap37	AT / AC	223	AJ309088	+	↑ (1.06)	S	↑ (1.14)	S	Translation initiation factor (SUI1)	AAD25609	<i>Arabidopsis thaliana</i>	94 / 2e-19	
CM	Pp.ap6	GT / G	429	AJ309083	+	↓ (0.50)	S	↑ (1.53)	S	Glucose regulated repressor protein (GRR1)	AAB70660	<i>Glycine max</i>	109 / 1e-23	
CM	Pp.ap40	AT / G	242	AJ309089	+	↑ (1.33)	S	↓ (0.88)	S	Glucose regulated repressor protein (GRR1)	AAB70660	<i>Glycine max</i>	59 / 1e-08	
CM	Pp.ap42	CA / AT	545	AJ309090	+	↑ (1.38)	S	↓ (0.51)	S	Sucrose-phosphate synthase (EC 2.4.1.14)	BAA19241	<i>Saccharum officinarum</i>	291 / 3e-78	
CM	Pp.ap54	AT / CC	348	AJ309093	+	↑ (1.29)	S	↑ (2.19)	S	Sucrose synthase (EC 2.4.1.13)	BAA88904	<i>Citrus unshiu</i>	203 / 8e-52	
CM	Pp.ap51	CA / GT	450	AJ419595	+	↑ (1.18)	S	↑ (3.27)	S	Pyrophosphate-dependent phosphofruktokinase (EC 2.7.1.90)	BAB11328	<i>Arabidopsis thaliana</i>	231 / 5e-60	
OM	Pp.ap4	GT / A	606	AJ309082	+	↓ (0.35)	S	↓ (0.19)	S	Acid phosphatase (EC 3.1.3.2)	AAA34135	<i>Lycopersicon esculentum</i>	190 / 8e-48	
OM	Pp.ap31	AG / AT	215	AJ300718	+	↑ (1.37)	S	↑ (1.73)	S	Glycolate oxidase (EC 1.1.3.15)	BAB01334	<i>Arabidopsis thaliana</i>	66 / 4e-11	
OM	Pp.ap14	G / CC	200	AJ309084	+	↑ (1.80)	S	↓ (0.57)	S	Nodulin like protein (MN3)	BAA96219	<i>Oryza sativa</i>	79 / 7e-15	
OM	Pp.ap36	AG / AC	317	AJ309118	+	↑ (1.16)	S	↑ (1.41)	S	Putative plasma membrane associated protein	BF516652	<i>Pinus taeda</i>	147 / 6e-33	
OM	Pp.ap44	G / AT	258	AJ309103	-	↓ (0.67)	S	↓ (0.51)	S	Metallothionein-like protein (EMBS30)	AAB01564	<i>Picea glauca</i>	56 / 1e-07	
CW	Pp.ap13	G / CC	446	AJ309095	-	↓ (0.56)	S	↓ (0.04)	S	Pectin methyl-esterase like protein (EC 3.1.1.11)	BAB01983	<i>Arabidopsis thaliana</i>	173 / 1e-42	
CW	Pp.ap20	G / AC	178	AJ309097	-	↓ (0.60)	S	↓ (0.31)	S	Glycine-rich protein homolog (PtaGRP2)	AAF75823	<i>Pinus taeda</i>	78 / 2e-14	
CW	Pp.ap32	AG / AC	466	AJ309100	-	↓ (0.58)	S	↓ (0.20)	S	Arabingalactan/prolin-rich protein (PtaGRP4)	AAF75826	<i>Pinus taeda</i>	48 / 5e-05	
D	Pp.ap1	G / C	294	AJ309081	+	↑ (1.27)	S	↑ (2.09)	S	Flavonoid 3'-hydroxylase (EC 1.14.13.21)	AAD56282	<i>Petunia hybrida</i>	151 / 1e-36	
D	Pp.ap26	AG / GA	313	AJ309086	+	↑ (1.95)	S	↑ (2.40)	S	Dihydroflavonol 4-reductase (EC 1.1.1.219)	BAA84940	<i>Camellia sinensis</i>	57 / 5e-08	
D	Pp.ap48	AT / C	326	AJ309091	+	↑ (2.02)	S	↑ (1.18)	S	Pathogenesis related protein (NTPRP2)	BAA81904	<i>Nicotiana tabacum</i>	113 / 1e-30	
D	Pp.ap49	AT / CC	253	AJ309092	+	↑ (1.23)	S	↑ (1.20)	S	Allene oxide synthase (EC 4.2.1.92)	CAB88032	<i>Lycopersicon esculentum</i>	71 / 2e-12	
D	Pp.ap16	G / AC	369	AJ309085	+	↑ (2.14)	S	↑ (1.73)	S	Glucosidase-like protein (EC 3.2.1.-)	CAB62327	<i>Arabidopsis thaliana</i>	136 / 1e-31	
Pp.ap10	G / GT	439	AJ309106	+	↑ (1.67)	S	↓ (0.57)	S	Hypothetical protein (T22E19.7)	AAF26483	<i>Arabidopsis thaliana</i>	45 / 5e-04		
Pp.ap15	G / AC	593	AJ309107	+	↑ (1.57)	S	↓ (0.70)	S	Hypothetical protein (F27D4.1)	AAD03372	<i>Arabidopsis thaliana</i>	251 / 6e-66		
Pp.ap23	AG / GA	364	AJ309109	+	↑ (1.38)	S	↓ (0.68)	S	Hypothetical protein (F15K9.5)	AAC72109	<i>Arabidopsis thaliana</i>	44 / 6e-04		
Pp.ap46	CA / GA	483	AJ309110	+	↑ (1.31)	S	↓ (0.64)	S	Hypothetical protein (F18Q22_220)	CAB87782	<i>Arabidopsis thaliana</i>	131 / 5e-30		
Pp.ap47	AG / GT	252	AJ309111	+	↑ (1.79)	S	↑ (1.13)	S	Hypothetical protein (F25A4.23)	AAD55296	<i>Arabidopsis thaliana</i>	91 / 3e-28		
Pp.ap2	G / C	289	AJ309104	-	↓ (0.34)	S	↑ (3.48)	S	Hypothetical protein (FSK20_280)	CAB88360	<i>Arabidopsis thaliana</i>	57 / 4e-08		
Pp.ap28	AG / GT	499	AJ309105	-	↓ (0.39)	S	↓ (0.66)	S	Hypothetical protein (F6E13.26)	AA023417	<i>Arabidopsis thaliana</i>	83 / 1e-15		
Pp.ap7	GT / CC	231	AJ309114	+	↑ (1.33)	S	↑ (2.06)	S	EST	BF518235	<i>Pinus taeda</i>	105 / 1e-20		
Pp.ap18	G / AC	255	AJ309122	-	↓ (0.67)	S	↓ (0.06)	S	EST	AW011420	<i>Pinus taeda</i>	72 / 2e-10		
Pp.ap25	AG / GA	348	AJ309123	-	↓ (0.65)	S	↓ (0.38)	S	EST	BG526931	<i>Pinus taeda</i>	591 / 1e-166		
Pp.ap33	AG / AC	319	AJ309124	-	↓ (0.86)	S	↓ (0.85)	S	EST	BF610233	<i>Pinus taeda</i>	311 / 2e-82		
Pp.ap34	AG / AC	326	AJ309125	-	↓ (0.64)	S	↓ (0.78)	S	EST	BF610233	<i>Pinus taeda</i>	294 / 3e-77		
Pp.ap9	GT / GT	477	AJ309115	+	↑ (1.24)	S	↑ (1.42)	S	no hit					
Pp.ap22	AG / GA	369	AJ309116	+	↑ (1.18)	S	↑ (1.11)	S	no hit					
Pp.ap27	AG / GA	278	AJ309117	+	↑ (1.77)	S	↑ (1.20)	S	no hit					
Pp.ap50	CA / GT	542	AJ309120	+	↑ (1.02)	S	↑ (1.07)	S	no hit					
Pp.ap43	CA / AT	350	AJ309126	-	↓ (0.06)	S	↓ (0.44)	S	no hit					

\* selective bases of each Pst and Mse primer enzyme combination; \*\* S: significant at p<0.05.

aj: Match to the maritime pine EST database.

- Pp.ap41 (684bp) hits to *Pinus thunbergii* Chlorophyll a/b binding protein type 1 (score/E-value: 363 / 1e-99; Accession number: CAA43907).
- Pp.ap35 (705bp) hits to *Cucumis sativus* Cytokinin-repressed gene CR9 (score/E-value: 88 / 9e-18; Accession number: BAA06153).
- Pp.ap37 (703bp) hits to *Arabidopsis thaliana* Translation initiation factor SUI1 (score/E-value: 213 / 2e-54; Accession number: AAD25609).
- Pp.ap31 (690bp) hits to *Arabidopsis thaliana* Glycolate oxidase (score/E-value: 124 / 1e-27; Accession number: BAB01334).
- Pp.ap12 (757bp) hits to *Arabidopsis thaliana* Putative wall-associated protein kinase (score/E-value: 43 / 4e-03; Accession number: AAG50588).
- Pp.ap22 (689bp) hits to *Arabidopsis thaliana* Hypothetical protein F27D4.1 (score/E-value: 251 / 6e-66; Accession number: AAD03372).
- Pp.ap46 (665bp) hits to *Arabidopsis thaliana* Hypothetical protein F15K9.5 (score/E-value: 44 / 6e-04; Accession number: AAC72109).
- Pp.ap47 (665bp) hits to *Arabidopsis thaliana* Hypothetical protein F18Q22\_220 (score/E-value: 131 / 5e-30; Accession number: CAB87782).
- Pp.ap48 (665bp) hits to *Arabidopsis thaliana* Hypothetical protein F25A4.23 (score/E-value: 91 / 3e-28; Accession number: AAD55296).
- Pp.ap2 (665bp) hits to *Arabidopsis thaliana* Hypothetical protein FSK20\_280 (score/E-value: 57 / 4e-08; Accession number: CAB88360).
- Pp.ap28 (665bp) hits to *Arabidopsis thaliana* Hypothetical protein F6E13.26 (score/E-value: 83 / 1e-15; Accession number: AA023417).

c): 5'-end amplification from library: Match to the non redundant database.

- Pp.ap3 (819bp) hits to *Pinus sylvestris* Chlorophyll a/b binding protein type 4 (score/E-value: 504 / 1e-142; Accession number: CAA78902).
- Pp.ap21 (914bp) hits to *Arabidopsis thaliana* Nucleoside diphosphate kinase III (score/E-value: 310 / 2e-83; Accession number: NDK3\_ARATH).

b): 3'-RACE: Match to the non redundant database.

- Pp.ap54 (787bp) hits to *Citrus unshiu* Sucrose synthase (score/E-value: 382 / 1e-105; Accession number: BAA88904).
- Pp.ap14 (588bp) hits to *Medicago truncatula* MN3-like protein (score/E-value: 94 / 2e-18; Accession number: BAA96219).
- Pp.ap1 (707bp) hits to *Pelargonium hortorum* Flavonoid 3'-hydroxylase (score/E-value: 179 / 3e-44; Accession number: AAG49315).
- Pp.ap46 (665bp) hits to *Arabidopsis thaliana* Hypothetical protein F18Q22\_220 (score/E-value: 134 / 7e-36; Accession number: CAB87782).

d): Full coding sequence available.

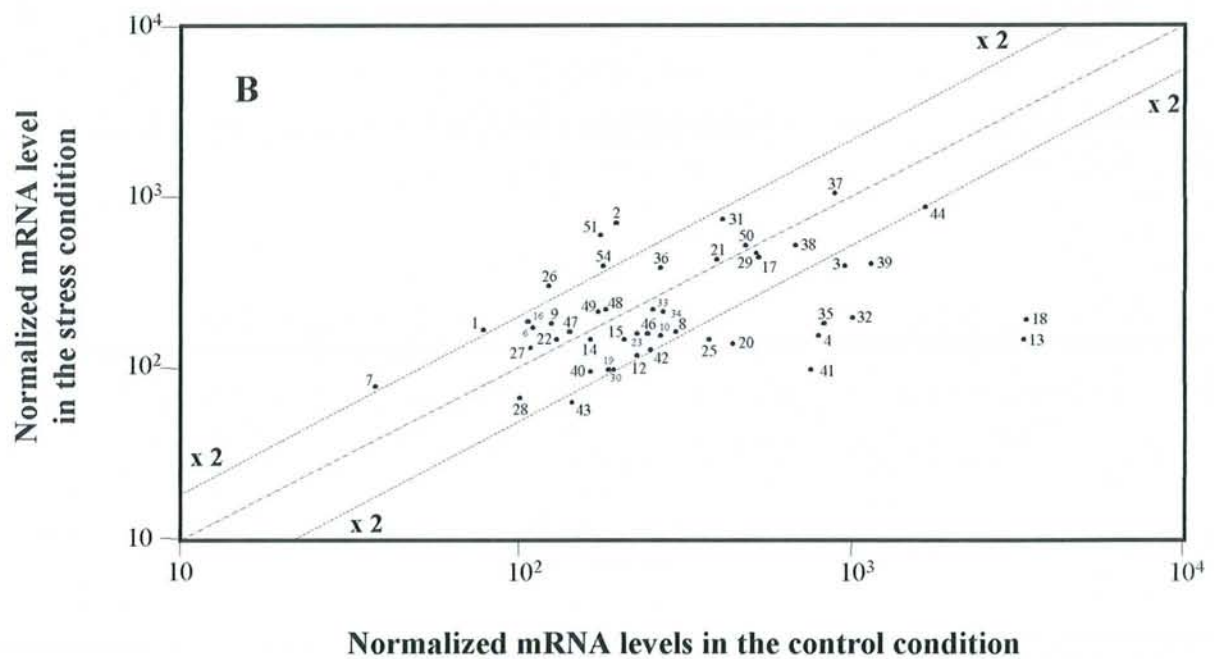
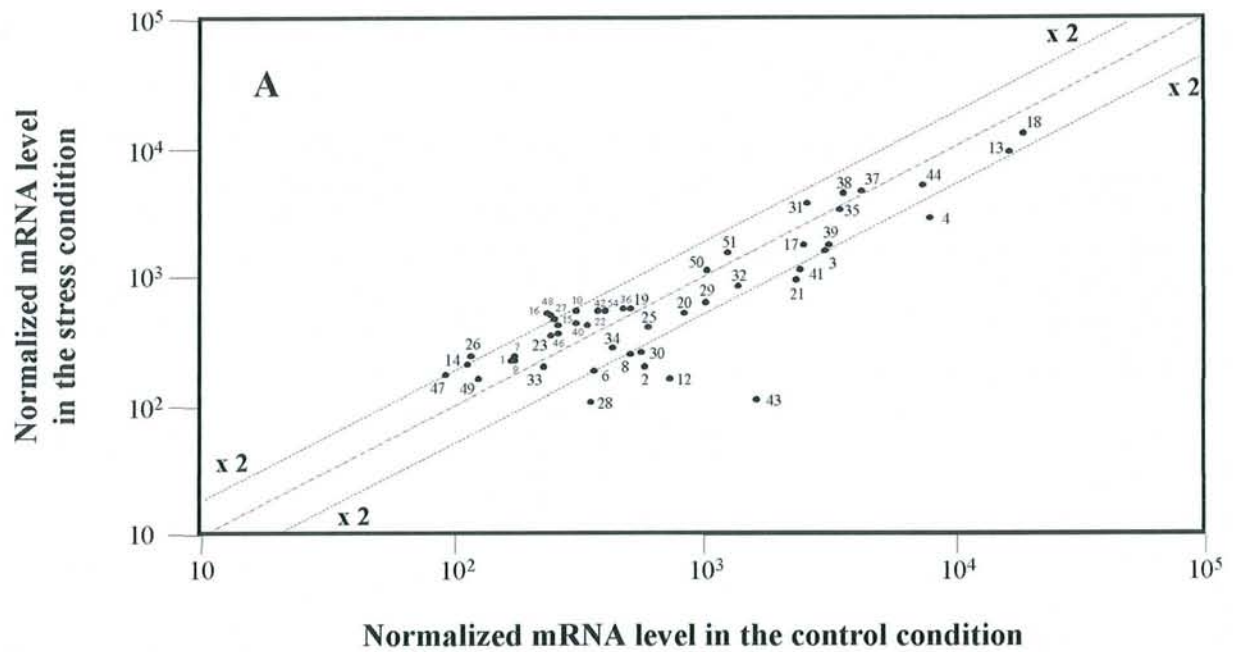


0.45MPa after 45 days of stress (Fig. 1B), from which the level of unsaturated ratio in MGDG decrease, probably indicates a stronger level of stress inducing irreversible damages in the photosynthetic apparatus, leading to the death of the plant.

#### Analysis of gene expression using the cDNA-AFLP technique

The cDNA-AFLP technique (Bachem et al., 1996) was used to identify differentially expressed genes in needles of maritime pine between seedlings growing under control and stress conditions. cDNA fragments were amplified using 80 primer-enzyme combinations (PECs) and revealed by silver staining. An average of 49 transcript-derived fragments (TDFs) per PEC was obtained, resulting in approximately 3950 screened cDNA fragments, ranging from 50 to 800 bp. Approximately 7.6% (300) of the TDFs were found to be differentially expressed between both conditions, of which 16% (48 fragments) displayed clear and reproducible “presence/absence” variation. Of these 48 TDFs, 28 increased while 20 decreased in response to drought (Table 1). All of them were sampled from the gel, re-amplified, cloned and sequenced.

Blast analysis showed that 31 of the 48 TDFs corresponded to known function genes, whereas seven corresponded to hypothetical proteins, five to *Pinus taeda* ESTs and only five did not match any sequences in the public databases. More sequence information toward the 3' and/or 5'-ends was also obtained for 11 fragments and, for five of them (Pp.ap3, Pp.ap19, Pp.ap21, Pp.ap35 and Pp.ap37), the full coding sequence was obtained. Pp.ap3 encoded a 251 amino acid protein (MW: 26.9kD, pI: 7.78) corresponding to a *Pinus palustris* chlorophyll a/b binding protein type 4, with 96% identity and similarity. Pp.ap19 encoded a 73 amino acid protein (MW: 8.2kD, pI: 5.1) corresponding to a transcription factor from *Arabidopsis thaliana* with 70% and 84% identity and similarity, respectively. Pp.ap21 encoded a 235 amino acid protein, (MW: 26.1kD; pI: 8.3). It presented 70% identity and 80% similarity with an *Arabidopsis thaliana* nucleoside diphosphate kinase III. Pp.ap35 encoded a 143 amino acid protein (MW: 15.3kD; pI: 5.1). It presented 41% and 57% identity and similarity, respectively, with a cytokinin-repressed gene from *Cucumis sativus*. Pp.ap37 encoded a 113 amino acid protein (MW: 12.6kD; pI: 8.8). This amino acid sequence matched with the *Arabidopsis thaliana* translation initiation factor SUI1, with 88% and 96% identity and similarity, respectively.



**Figure 2:** Scatter plots showing expression levels of the 48 transcript-derived fragments isolated from needles using cDNA-AFLP, between the control and drought-stress conditions. For each clone, numbered as in Table 1, transcript levels are expressed in arbitrary units and plotted on a log-log scale. Dotted lines indicate 2-fold expression differences between control and stress conditions. **A)** needle probes; **B)** root probes.

### Quantitative analysis of gene expression by reverse northern

The 48 TDFs isolated previously were analysed using reverse northern to quantitatively measure the relative abundance of the transcripts in needles and roots. Overall, the two techniques agreed, validating the result obtained by cDNA-AFLP, and confirming the effectiveness of this technique to detect differentially expressed genes. However, in respect to the degree of variation, the qualitative variants (presence/absence) observed in the cDNA-AFLP, always showed a quantitative variation in reverse northern. This striking result demonstrates that none of the studied genes was in fact specifically expressed in either the non stressed or the drought stressed condition. It should be also noticed that the statistical design used for the reverse northern experiment also allowed to detect rather small changes that would have remained undetected if the classical  $\pm$  two-fold ratio was used (Fig. 2).

In needles (Fig. 2A), the nature of the variation (increase, decrease) was identical between the cDNA-AFLP and reverse northern (Table 1) for most of the clones (43/48). Out of these 43 clones, 25 displayed significant differences between the two conditions from which 11 and 14 increase or decrease by a factor ranging from 1.18 to 2.14 and 1.49 to 16.6, respectively. For the remaining clones (5/48), the nature of the variation was different between both procedures and four (Pp.ap4: acid phosphatase, Pp.ap6: glucose regulated repressor protein, Pp.ap12: putative plasma membran protein, and Pp.ap38: RNA helicase/RNase III protein) presented a significant difference in spot intensity based on the ANOVA model. To explain this opposite behaviour, it must be recalled that one of the most intriguing findings from recent genomic and EST sequencing projects is the omnipresence of large gene families in plant genomes. This observation particularly applies for conifers, whose genes are organized in complex families (Kinlaw and Neale, 1997). Therefore, it is possible that different members of these genes were revealed by the two techniques. Among known function genes, the highest and lowest differential expression were for glucosidase (Pp.ap16, 2.14-fold increase) and a protein kinase (Pp.ap12, 4.8-fold decrease). Among unknown function genes, clones were found to increase or decrease by a factor of up to 1.79 (Pp.ap47) and down to 16.6 (Pp.ap43), respectively.

The expression pattern of the drought responsive genes detected in needles by cDNA-AFLP, was also studied in roots by reverse northern (Fig. 2B). In this tissue, a total of 30 clones (62.5%) displayed significant differences between the control and drought stress conditions, from which 9 and 21 increase or decrease by a factor ranging from 1.41 to 3.48 and 1.33 to 25.0, respectively. Among known function genes, the highest and lowest

differential expression were for a pyrophosphate-dependent phosphofructokinase (Pp.ap51, 3.27-fold increase) and a pectin methyl-esterase (Pp.ap13, 25-fold decrease). Among unknown function genes, clones were found to increase or decrease by a factor of up to 3.48 (Pp.ap2) and down to 16.7 (Pp.ap18), respectively.

Most of the clones (75%) presented a similar pattern of expression between both conditions in needles and roots. However, although the nature of variation appears to be conserved between both organs the degree of variation remain closely linked to each organ. Interestingly, some clones presented an opposite behaviour between needles and roots suggesting a tissue specific regulation of the corresponding genes.

When the clones were assigned to functional categories (Table 1), it was found that photosynthesis, cell wall, growth and development (excepted clone Pp.ap38) related genes, decreased during drought in both tissues, while genes involved in defence mechanisms and carbohydrate metabolism (excepted clone Pp.ap6 in needles and, clone Pp.ap40 and Pp.ap42 in roots) increased. Conversely, most related genes to the signal transduction, transcription and translation, other metabolism and of unknown function displayed opposite expression pattern in needles and roots.

## Gene function and expression

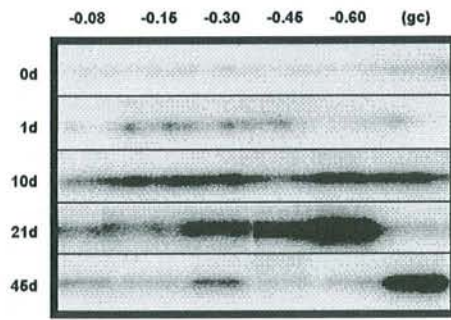
### *Photosynthesis related genes*

The five clones classified in this functional category presented a decrease of expression in needles and roots (Table 1). Clone Pp.ap30 (309bp) was similar to the preprotein translocase SecA. This protein is synthesized in the nucleus and transported to the chloroplast stroma or the thylakoid membrane. This gene product is a member of the Sec protein family and acts as a protein carrier through the stroma to the thylakoid (Voelker et al., 1997). To our knowledge, this is the only report showing the repression of this gene under abiotic stress. Clones Pp.ap3 (751bp) on the one hand, and Pp.ap39 (363bp) and Pp.ap41 (333bp) on the other hand corresponded to chlorophyll a/b-binding proteins (Cab) type 4 and type 1, respectively. A 819bp sequence was obtained by 5'-end amplification of Pp.ap3. Pp.ap41, perfectly matched within a 684bp EST of the maritime pine EST database. These three proteins are involved in the antenna system of the photosynthetic apparatus. Clone Pp.ap17 (445bp) corresponded to the small subunit of the ribulose-biphosphate carboxylase (rbcS, EC 4.1.1.39). This gene is involved in carbon metabolism by atmospheric CO<sub>2</sub> fixation,

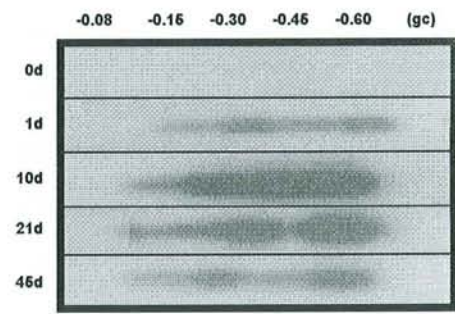
and actively participates in photosynthesis. These results are consistent with a previous study in maritime pine, where a decrease in protein expression for other photosynthesis-related genes such as rubisco activase and an increase in rbcS protein degradation during drought were found (Costa et al., 1998). Drought has been already reported to modify the expression level of photosynthesis related genes in other plant species (Bartholomew et al., 1991).

#### *Growth and development*

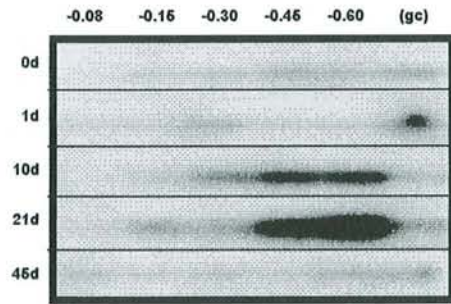
This category was represented by three clones characterized by a clear decrease in the roots, but being enhanced or repressed in needles (Table 1). Pp.ap8 (193bp) was similar to the gibberellin-stimulated transcript 1 (GAST1) from tomato (Shi et al., 1992). In *Gerbera hybrida*, the corresponding gene product was found to be involved in the shape regulation of both corolla and carpel through the control of cell division (Kotilainen et al., 1999). Moreover, these authors suggested that this gene played a role in the phytohormone mediated cell expansion. Shi and Olszewski (1998) showed that the GAST1 expression was enhanced by gibberellin and repressed by abscisic acid. In our experiment, its significative decrease (2-fold) observed in needles and roots could be linked to the decrease of growth via the ABA pathway. Clone Pp.ap35 (291bp) corresponded to the CR9 protein for which the expression level was found to be down-regulated by cytokinin in cucumber (Teramoto et al., 1994). It matched perfectly with another maritime pine EST of 705bp, confirming the function of this TDF. Cytokinins are known to be involved in cell cycle and development (D'Agostino and Kieber, 1999). It was clearly found to be repressed in roots (4.5 fold decrease), but increased in needles by the cDNA-AFLP technique (result confirmed by classical northern, data not shown). Clone Pp.ap38 (317bp) was similar to the CAF gene, an RNA helicase/RNase III gene. RNase III proteins are involved in processing rRNA and some mRNA molecules. In *Arabidopsis thaliana*, CAF was found to suppress cell division in floral meristems (Jacobsen et al., 1999). The CAF mutant exhibited other defects, including the absence of axillary inflorescence meristems, and abnormally shaped leaves and floral organs. This result indicates the possible role of the CAF gene in developmental processes. Again, its accumulation was found to be repressed in roots and this decrease could be related to the cessation of growth and development in drought-stressed roots. In needles, contradictory results were observed between the cDNA-AFLP and the reverse northern as discussed earlier.



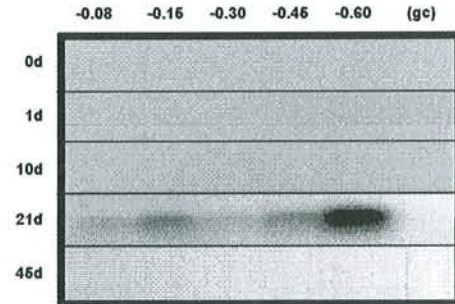
**A: Pp.ap12**



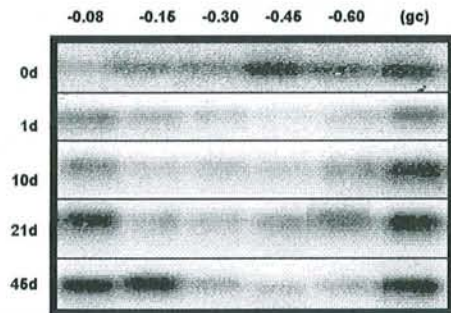
**B: Pp.ap14**



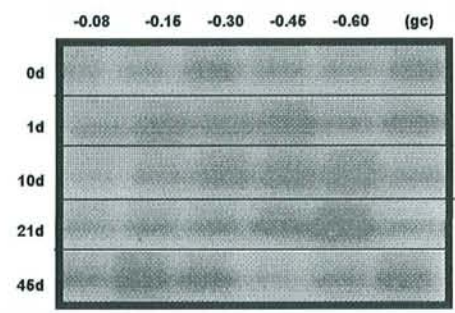
**C: Pp.ap36**



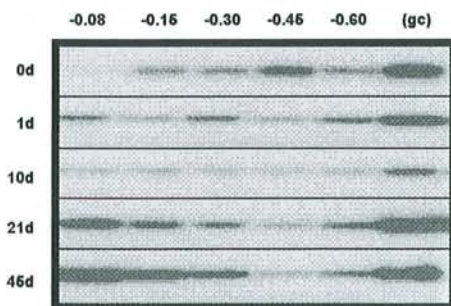
**D: Pp.ap1**



**E: Pp.ap2**



**F: Pp.ap23**



**G: Pp.ap25**

**Figure 3:** Time course RT-PCR analysis of seven clones in needles under both the control (C) and stress (S) conditions. Samples Pp.ap1, Pp.ap2, Pp.ap12 and Pp.ap14 correspond to 20 cycles of PCR amplification, and samples Pp.ap23, Pp.ap25 and Pp.ap36 to 15 cycles. For each experiment, ubiquitin was used as an internal control for the PCR amplifications. Samples corresponding to “0d” (i.e. before the stress was applied), “-0.08MPa” (i.e. a non stressed hydroponic medium) and “gc” (i.e. a well watered ground medium) were used as controls.

Overall it seems that the genes related to growth and development are down-regulated in maritime pine seedlings faced to drought, which agree with a general behaviour of growth cessation at the phenotypic level.

#### *Signal transduction, transcription and translation*

Five clones were assigned to this category. Clone Pp.ap29 (319bp) was similar to an ADP-ribosylation factor-like protein (ARF), a low molecular mass GTP-binding protein involved in vesicle trafficking and signal transduction found in animals as well as in plants (Marcote et al., 2000). Although not significant, a slight decrease of Pp.ap29 was observed in drought stressed tissues. Clone Pp.ap21 (397bp) corresponded to nucleoside diphosphate kinase NDK (EC 2.7.4.6.), an enzyme involved in both protein/DNA synthesis and transduction signaling (Steeg et al., 1988). A 914bp sequence was obtained by 5'-end amplification. Its involvement in growth and development was clearly demonstrated by Pan et al. (2000) using transgenic rice. These authors used an NDK-antisense construction inducing a decrease in NDK activity. They showed that the cell elongation process was inhibited in transgenic plants compared to normal plants. In our experiment, the messenger of this protein was found to clearly decrease in needles (2.6-fold) under drought-stressed conditions, most likely in relation to growth cessation. Clone Pp.ap12 (525bp) was similar to the Arabidopsis cell wall-associated receptor kinase gene family (WAK) and perfectly matched with a maritime pine EST of 757bp. All members of this gene family encode cytoplasmic serine/threonine kinase that spans the plasma membrane and extends into the extracellular region to bind tightly to the cell wall (He et al., 1996). Expressions were found as regulated by pathogen infection or salicylic acid treatment and organ specific, suggesting a potential role as both linkers of the cell wall to the plasma membrane, and as signaling molecule (He et al., 1999). Our experiment suggest that members of this gene family could be involved in the drought stress perception and transduction through the cell. As discussed earlier, we observed an opposite behaviour between the cDNA-AFLP (increase) and reverse northern (4.8- and 2-fold decrease in needles and roots, respectively). However, RT-PCR analysis in the factorial design confirm the result obtained by cDNA-AFLP and showed low expression under both control and stress conditions after 1 day of stress (Fig. 3A). Transcript accumulation started to increase after 21 days, reaching a maximum at -0.60MPa. After 45 days of stress, it returned to a low level of expression. These results point out the complexity of this gene family which could be more pronounced in large genome species such as maritime pine (51pg/2C, Chagné

et al., 2002). Clone Pp.ap19 (703bp) presented interesting similarities with the SPT4 gene which is involved in the assembly, organization, modification and disassembly of the chromatin structure. Chromatin modifications play a role in the control of transcription (Hartzog et al., 1996). In our experiment, opposite expression were observed in drought stressed needles and roots, showing a tissue specific regulation of this gene. Clone Pp.ap37 (223bp) corresponded to the universal eucaryotic translation initiation factor SUI1 (present in yeast, nematodes, humans and plants) which promotes the selection of the initiator Met-tRNA<sup>iMet</sup> (Kyrpides and Woese, 1998). This TDF perfectly matched with a maritime pine EST of 703bp. Although not significant, its expression was found to slightly increase under drought-stressed conditions. To our knowledge there is no report on the involvement of this translation initiation factor in drought stress response.

#### *Carbohydrate metabolism*

Five clones were assigned to this category. Clones Pp.ap6 (429bp) and Pp.ap40 (242bp) were similar to the glucose regulated repressor protein GRR1, a central component of a glucose signal transduction mechanism responsible for glucose-induced gene expression. GRR1 is also involved in the *Saccharomyces cerevisiae* ubiquitin proteolysis machinery. The GRR1 protein also plays a role in regulating the cell cycle since it is required for the degradation of G1 cyclins Cln1 and Cln2 (Barral et al., 1995; Ning Li and Johnston, 1997). Although they were found to be enhanced in needles by cDNA-AFLP, they presented opposite variation on reverse northern. Interestingly the expression patterns in roots were opposite to those found in needles. Although these two clones were similar to the same GRR1 gene, the translation of their common sequence presented only 65% of identity and 81% of similarity. These results may indicate the presence of at least two members whose expression seems to be tissue specific. Clone Pp.ap42 (545bp) and Pp.ap54 (348bp) corresponded to sucrose-phosphate synthase (SPS, EC 2.4.1.14) and sucrose synthase (Susy, EC 2.4.1.13), respectively. A 787bp consensus sequence for Susy was obtained using 3'-RACE. These two enzymes catalyze the reversible conversion of sucrose or sucrose-phosphate, respectively to UDPglucose and either D-fructose or D-fructose 6-phosphate. Increase in SPS activity has been described in many plant species facing drought (e.g. Geigenberger, 1999). On cDNA-AFLP profiles, both were found to be enhanced under the drought-stressed conditions. Northern hybridization confirmed that SPS increased in needles (data not shown). Induction of Susy was also reported during various stresses such as cold or O<sub>2</sub> deficiency (Hesse and



Willmitzer, 1996; Zeng et al., 1998). Its induction was also found in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* during water deprivation (Kleines et al., 1999). Interestingly both clones presented opposite trends in the roots: 2-fold decrease for SPS and 2-fold increase for Susy. Clone Pp.ap51 (450bp) was similar to a pyrophosphate-dependent phosphofructokinase (diphosphate-fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase; EC 2.7.1.90). This key enzyme of the primary metabolism (Gibbs et al., 2000) catalyzes the reversible conversion of diphosphate and D-fructose 6-phosphate (glycolytic process) to phosphate and D-fructose 1,6-bisphosphate (gluconeogenic process). It was found to increase in both tissues with a particularly strong increase in root (3.27-fold increase).

The regulation of these five genes shows the central role of soluble carbohydrate in the response of maritime pine seedlings to drought, by contributing to osmoregulation and cell cycle.

#### *Other types of metabolism*

Clone Pp.ap4 (606bp) corresponded to a phosphatase acid precursor type 1 (EC 3.1.3.2). This enzyme is involved in phosphate metabolism but its real metabolic function has not been fully established due to the occurrence of multimeric forms of the enzyme, and the lack of substrate specificity (Duff et al., 1994). The accumulation of this gene product found in stressed needles by cDNA-AFLP was confirmed on northern blot (data not shown), but strongly disagree with the results found by reverse northern in both tissue were it presented a 2.8 to 5.3-fold decrease. Again, different members may have been detected by both techniques. Shih and Kao (1998) have already reported increased phosphatase acid activity in detached rice leaves subjected to water-, osmotic-, and salt-stress. The same trend was found in spinach and wheat (Pan, 1987). Clone Pp.ap31 (215bp) corresponded to glycolate oxidase (EC 1.1.3.16). This TDF matched perfectly within a maritime pine EST of 696bp, confirming the function of this TDF. This transcript was found to increase in both tissues. Clone Pp.ap14 (200bp) was similar to *Medicago truncatula* nodulin-like protein (MtN3), from which a 588bp sequence was obtained by 3'-RACE. The expression of this gene was found to increase in rhizobium-induced nodule development in *Medicago truncatula* (Gamas et al., 1996). RT-PCR analysis showed that the expression of Pp.ap14 was progressively enhanced in needles, with a maximum reached after 10 to 21 days of stress. After 45 days of stress, its expression clearly decreased, exhibiting time and dose-stress dependent expression (Fig. 3B). Its function in the photosynthetic tissue of maritime pine

remains unclear although it is clearly involved in the water stress response. It should be also noticed that it presented a 1.8-fold decrease in the roots. Clone Pp.ap36 (317bp) corresponded to a putative plasma membrane associated protein. In our experiment the corresponding transcript was found to increase in the studied tissues in drought stresses medium. The modification of this gene expression could be linked to the membrane modifications occurring during water deprivation. Additional characterization was performed by RT-PCR. A low expression was observed in the control samples. Then it started to increase gradually until a maximum was reached on day 21 at  $-0.60\text{MPa}$  (Fig. 3C). Finally, it returned to the initial expression level on day 45. Clone Pp.ap44 (258bp) corresponded to a metallothionein like protein. At the protein level, this EST encodes for only 33 amino-acids of which the 22 C-terminal amino acids match with the C-terminal tail of the EMB-30 protein of *Picea glauca* (a member of the class 15 metallothioneins). The remaining 11 N-terminal amino-acids did not correspond to EMB30, suggesting that Pp.ap44 belongs to a new class of metallothionein-like protein or an other member of this class. Its decrease detected by cDNA-AFLP was confirmed for both tissues by reverse northern.

#### *Cell wall related genes*

The three clones belonging to this category presented a clear decrease of expression in needles and roots during drought. Clone Pp.ap13 (446bp) was identical to a member of the pectin methylesterase multigene family (PME, EC 3.1.1.11). PMEs are involved in cell wall metabolism, by demethylating esterified pectin during their incorporation into the extracellular matrix (Goldberg et al., 1996). Pp.ap13 was found to be strongly repressed in roots (25-fold decrease). Clone Pp.ap20 (178bp) corresponded to a glycine-rich protein (GRP) homolog of *Pinus taeda*. It was shown to be highly expressed in the side wood of bent trees (Zhang et al., 2000), and not expressed in needles. Clone Pp.ap32 (466bp) exhibited some similarity with another cell wall protein, an arabinogalactan/proline rich protein (AGP) of *Pinus taeda* (Zhang et al., 2000).

#### *Plant defence related genes*

All five genes related to the plant defence category increase their expression in drought stressed tissues. Clone Pp.ap1 (294bp) corresponded to flavonoid 3'-5'-hydroxylase (F3'H, EC 1.14.13.21), from which a 707bp sequence was obtained using 3'-RACE. Clone Pp.ap26 (313bp) was similar to dihydroflavol 4-reductase (DFR, EC 1.1.1.219). F3'H catalyzes the synthesis of dihydroflavonol from naringin. The following step, in the anthocyanin pathway, is catalyzed by DFR, which synthesizes flavan-3,4-diols from dihydroflavonol. Induction of F3'H mRNA and protein has already been described in *Catharanthus roseus* under UV radiation (Kaltenbach et al., 1999). In our experiment, the accumulation of this transcript was confirmed by RT-PCR, as shown in Figure 3D. From the different conditions of the factorial design, the transcript level of Pp.ap1 was clearly found to be time dependent, being highly expressed only after 21 days of stress, and exhibited a dose-stress response with a maximum expression at -0.60MPa. Induction of DFR mRNA was also described during nitrogen deficiency and drought stress (Bongue-Baetelsman and Philips, 1995; Iuchi et al., 1996). The induction of anthocyanin biosynthesis genes and consecutively the increased production of anthocyanins is a well known biochemical mechanism in plants facing various stresses, such as UV-B radiation, oxidative stress and drought stress (Yang et al., 2000; Kennedy and Filippis., 1999). Clone Pp.ap48 (326bp) was similar to a pathogenesis related protein NtPRP-27. The NtPRP-27 transcript was isolated from cultured cells of tobacco (Okushima et al., 2000). The corresponding transcript accumulated during infection by the mosaic virus, and when faced with mechanical and drought treatments. Interestingly, this protein was described by Okushima et al., (2000) as indicating the existence of a novel PR protein family in tobacco. In this paper, we report for the first time the presence of this gene in a conifer species and its increased expression in drought-stressed seedlings. Clone Pp.ap49 (253bp) corresponded to allene oxide synthase (AOS, EC 4.2.1.92), a cytochrome P450 protein, which is the first enzyme involved in the lipoxygenase pathway (Laudert et al., 1996). More particularly, this protein is involved in the octodecanoid pathway as a precursor of the jasmonic acid (JA) phytohormone (Maucher et al., 2000). JA is known to be involved in regulating the expression of certain plant defence genes in response to various stresses. Following several studies reporting the detection of increased jasmonate production in plant tissue exposed to water stress, it has been suggested that JA plays a role in the water deficit response (Sembdner and Parthier, 1993). In flax (*Linum usitatissimum*), Harms et al., (1998) reported that wound-induced AOS mRNA accumulation was correlated with the increase in

the level of JA. In addition, in wounded tobacco over-expressing flax AOS, Wang et al., (1999) showed that the accumulation of JA was also accompanied by the accumulation of the PR-1 mRNA level. Moons et al., (1997) also showed that JA accumulation had a direct effect on gene expression, particularly on PR-1 and PR-10, during salt stress or ABA treatment. These results are consistent with our finding regarding relationships between the enhanced expression of maritime pine AOS and the enhanced expression of PR-10 (Dubos and Plomion, 2001a). Clone Pp.ap16 (369bp) corresponded to Glucan endo-1,3-beta-glucosidase, a beta-1,3-glucanase-like protein (EC 3.2.1.39). In other studies, this gene has been described as being induced during pathogen infection (Vogeli-Lange et al., 1994), ozone treatment (Pell et al., 1997) freezing (Hincha et al., 1997) and also water deprivation (Cui et al., 2000). Here we report on its accumulation in drought-stressed seedlings of a pine species.

The unambiguous increase of defence related genes in drought stress maritime pine seedlings agree with the general behaviour of this functional category on plants submitted to abiotic stresses.

#### *Hypothetical protein*

Among the differentially expressed TDFs, seven corresponded to hypothetical proteins from *Arabidopsis thaliana*. In needles, five clones increased (Pp.ap10, Pp.ap15, Pp.ap23, Pp.ap46 and Pp.ap47), while two decreased (Pp.ap2 and Pp.ap28). Clone Pp.ap2 was highly repressed in needles (2.9-fold decrease) and enhanced in the roots (3.5-fold increase). The decrease expression in the photosynthetic tissue was confirmed by RT-PCR (Fig. 3E). The encoded transcript was constitutively expressed throughout the different samples. However, a decreased expression started after one day of stress and remain at a low level until day 45, for all the stress conditions. This result confirms the behaviour found using cDNA-AFLP. Pp.ap23 was also analyzed by RT-PCR. It was found to be expressed in all the samples of the factorial design (Fig. 3F). Increased expression started after one day of stress, reaching a peak on day 21 and returning progressively to a basal level on day 45.

#### *Expressed sequence tag (EST)*

All five differentially expressed TDFs that presented homology with EST from *Pinus taeda* presented the same behaviour in both tissues. One clone increased (Pp.ap7), while the other four decreased (Pp.ap18, Pp.ap25, Pp.ap33, and Pp.ap34). It should be noticed the

strong decrease (16.7-fold) of clone Pp.ap18 in the roots. Clone Pp.ap25 was further characterized using RT-PCR (Fig. 3G). The encoded transcript was constitutively expressed throughout the different samples. However, minimum expression was reached at  $-0.45\text{MPa}$  after 21 and 45 days of stress, confirming the result found by cDNA-AFLP.

#### *Sequences without hit on public databases*

Finally, five clones showed no significant homology to public databases. The full sequence of the *Arabidopsis* genome being close to full completion (*Arabidopsis* Genome Initiative, 2000), the identification of new sequences suggests that they might correspond to a highly divergent sequence of *Arabidopsis* genes or to genes specific to the species studied. They might also correspond to very rare transcripts that have not yet been found in current pine EST projects. Further studies are now needed to delineate the functions of these genes that were found to increase (Pp.ap9, Pp.ap22, Pp.ap27, and Pp.ap50) or decrease (Pp.ap 43) between the well watered and drought stressed conditions.

### CONCLUSION AND PERSPECTIVES

In most cases where the differentially expressed TDFs were checked by reverse northern, the result obtained by cDNA-AFLP was confirmed. This clearly demonstrates the ability of the cDNA-AFLP technique to identify truly differentially expressed genes. However in few cases a strong divergence was observed, suggesting that full characterization of these genes would be needed before any conclusion can be drawn. Most of the known function genes that were found to be affected by drought in maritime pine seedlings corresponded to categories already described as being affected by abiotic stresses in other plants, but still no dehydration tolerance genes such as dehydrin, *lea* and *rab* were detected in this experiment. Interestingly, some known function genes have never been described as being affected by drought in any organism (e.g. translocase *secA*, nodulin-like protein, translation initiation factor), showing that pine trees could respond to drought stress by strengthening specific genes that have not been found as being affected by drought in annual plants.

Whether the drought-responsive genes that were identified in this study actually play important roles in drought tolerance remains to be determined. Our strategy will consist of mapping these candidate genes on genetic maps where QTLs for physiological traits (e.g. carbon isotope discrimination) have been localized (Costa, 1999; Brendel et al., 2002). The

SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) technique is currently being used to map these genes (Plomion et al., 1999). Any co-location between a gene and a QTL could be further validated by genetic transformation in maritime pine, and/or the phenotypic evaluation of the corresponding mutated *Arabidopsis* plants.

The relatively high proportion of isolated sequences corresponding to hypothetical protein, expressed sequence tags or presenting no hit on public databases (35.4%) underscores how little we know about gene function under drought stress conditions. Characterization of expression patterns of unknown genes using microarrays will facilitate functional analysis of these genes. This is the goal of the Lignome project that has been launched by INRA for several woody plants including maritime pine (<http://www.pierroton.inra.fr/Lignome/>).

## MATERIAL AND METHODS

### Plant material and water deficit application

*Pinus pinaster* Ait. seeds were sterilized and then placed on moistened filter paper until germination according to Nguyen and Lamant (1989). Five groups of 100 randomly chosen seedlings were selected and transferred to an aerated nutrient solution (Seillac, 1960). After three weeks of growth, a drought stress treatment was applied to seedlings by lowering the osmotic potential of the nutrient solution using polyethylene glycol (PEG3350, Sigma-Aldrich and Co, Saint Louis, Missouri, USA) as osmoticum. Different osmoticum have been tested to induce a drought stress on hydroponically grown maritime pine seedlings, including sorbitol, mannitol and different molecular weights PEG. Triboulot (1996) showed that PEG3350 combined the advantage of low to absence of toxicity and good aeration of the nutrient solution. Indeed, on the one hand low molecular weight PEGs (<1000 g/mol) have been shown to be highly absorbed by the plant, and to induce toxicity and eventually mortality. On the other hand high molecular weight PEGs (>6000 g/mol) are too viscous and can induce anoxia when they are used in long term experiments. PEG3350 from Sigma is also free of heavy metal contamination, reducing the toxicity risks of this compound. One group of seedlings, raised in Seillac solution (-0.08 MPa), was used as a control, whereas other plants were raised under four drought-stressed conditions obtained by increasing levels of PEG (-0.15, -0.30, -0.45 and -0.60 MPa). A time course expression analysis was performed considering five points: just prior to stress application and 1, 10, 21 and 45 days after the drought stress treatment had been started. An additional group of unstressed plants was raised

in a mixture containing bark/peat/sand (1:1:1), and was used as a second control for each sampling date. Each sample was immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until use. Media were changed once a week to avoid fungal contamination. The experiment was conducted in a growth chamber under a 16/8h light/dark regime, 24/18°C temperature, 45/70% humidity, and a quantum flux of 260  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .

#### Physiological measurements

##### *Chlorophyll content*

Chlorophyll a and b contents were measured in 80% (v/v) acetone extracts following the method of Arnon (1949).

##### *Lipid extraction*

Needles from three maritime pine seedlings per sample (2.5 g) were extracted 3 times with 5 ml of chloroform-methanol (2:1 v/v). Four ml of water were added to the extract and centrifugated for 10min at 4000g. Chlorophorm and methanol were removed from organic phases with a vacuum evaporator. The residues containing lipids were finally resuspended in 2 ml of chloroform. Different classes of lipids were separated on silica gel plates according to Heape et al. (1985).

##### *Analysis of fatty acids*

Methyl fatty acids were obtained using Chapman's protocol (Chapman et al., 1987). Methyl esters of fatty acids were analyzed using a gas chromatograph (chrompack CP 9000, Varian S.A, Les Ulis, France) equipped with a 25m long 0.25mm id BPX 70 column (SGE, 70% cyanopropyl). The oven temperature during the runs was 140°C, increased to 240 °C at a rate of 3°C/min (Flame Ionization Detector). The detector and injector were maintained at 240°C. Helium was used as the gas carrier. The identification of fatty acids was confirmed by co-chromatography with authentic standards (Sigma-Aldrich and Co, Saint Louis, Missouri, USA) and electron impact mass spectroscopy (AutoSpec-EBEQQ, Fisons instruments, Beverly, MA, USA) coupled to a gas chromatograph equipped with a BPX 70 column (SGE France SARL, Courtaboeuf, France).

### **mRNA fingerprinting**

All PCRs were performed using the GeneAmp® PCR system 9700 (Perkin Elmer, Foster City, CA, USA), and the *Taq* polymerase and buffer from Life technologies-Gibco BRL (Gaithersburg, MD, USA).

#### *RNA extraction, purification and cDNA synthesis*

Total RNA was extracted following Chang et al., (1993) from needles and roots of two bulks of 50 seedlings, each corresponding to the non-stressed and stressed conditions (-0.45Mpa) after 21 days of stress. Extracts were DNase RQ1 RNase free (Promega, Madison, WI, USA), digested and cleaned using the RNeasy® Plant kit (Qiagen, Valencia, CA, USA). Total RNA concentration was determined spectrophotometrically. Poly(A<sup>+</sup>) RNA was prepared from 100µg of total RNA, using the Oligotex™ kit (Qiagen), followed by double-stranded cDNA synthesis (cDNA synthesis kit, Promega). cDNA's were chloroform-isoamylalcohol (24:1) extracted, ethanol-precipitated and taken up in a final volume of 40µl of DEPC treated H<sub>2</sub>O. All steps were carried out according to manufacturers instructions. cDNA quality was checked by PCR using primers corresponding to cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD:, EC 1.11.1.7) and a transcription factor of the MYB family (Plomion et al., 1999). PCR's were performed in 25µl of 1X buffer, containing 0.1mM dNTPs, 0.2µM of each primer, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5U *Taq* DNA Polymerase and 1µl (2ng) of cDNA. Amplifications were carried out following the cycling parameters: preliminary denaturation (4min, 94°C), then 35 cycles of denaturation (30s, 94°C), annealing (30s, 55°C or 58°C, respectively) and extension (1min, 72°C), and final extension (10min, 72°C).

#### *Non radioactive cDNA-AFLP reaction*

cDNA-AFLP reactions were performed as described by Bachem et al. (1996) with minor modifications. The digestion-ligation step was carried out simultaneously for 3h at 37°C in a total volume of 15µl, containing 10µl (50ng) of cDNA, 1.5U of restriction enzymes (*Pst*I, *Mse*I), 0.5U of *T4* DNA ligase, 0.15mM ATP, 1pmol *Pst*I adaptor, 10pmol *Mse*I adaptor in a 1X One Phor All buffer. Enzymes and buffers were obtained from Amersham-



Pharmacia Biotech (Uppsala, Sweden). Sequences designed for the positive and negative strand from both *Pst*I and *Mse*I adaptors corresponded to *Mse*I Adaptor1 (5'-GACGATGAGTCCTGAG-3'), *Mse*I Adaptor2 (5'-TACTCAGGACTCAT-3'), *Pst*I Adaptor1 (5'-CTCGTAGACTGCGTACATGCA-3') and *Pst*I Adaptor2 (5'-TGTACGCAGTCTAC-3'). Digested-ligated cDNA fragments were diluted ten-fold and used as a template for the first amplification (preamplification). Preamplification was performed in a total volume of 25µl of 1X buffer, containing 0.2mM of each dNTP, 0.25µM of each non selective primer (*Pst*I primers: 5'-GACTGCGTACATGCAG-3'; *Mse*I primers: 5'-GATGAGTCCTGAGTAA-3'), 1.2mM MgCl<sub>2</sub>, 0.4U *Taq* DNA Polymerase and 10µl of cDNA diluted fragments. PCR was carried out using the following procedure: preliminary denaturation (4min, 94°C), then 28 cycles of denaturation (30s, 94°C), annealing (30s, 60°C) and extension (1min, 72°C). A total of 5µl of preamplification product were fractionated on an ethidium bromide 1% agarose gel. A smear was present near 500bp. The preamplification products were diluted 35-fold to be used as starting material for the second amplification reaction. Primers were complementary to the adaptors *Pst*I and *Mse*I, with one or two additional selective 3'-end nucleotides (*Pst*I primers: 5'-GACTGCGTACATGCAGX-3', where X corresponded to G, AG, AT, CA, CC; *Mse*I primers: 5'-GATGAGTCCTGAGTAAAX-3', where X corresponded to A, C, G, AC, AT, CC, GA and GT). Selective PCR reactions were performed in 10µl of 1X buffer, 0.1mM of each dNTP, 0.15µM *Pst*I and 0.30µM *Mse*I primers, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5U *Taq* DNA Polymerase and 2.5µl of the diluted preamplification. Selective amplifications were carried out using the following cycling parameters: preliminary denaturation (4min, 94°C), one cycle of 30s at 94°C, 30s at 65°C, 1min at 72°C, 13 cycles with the annealing temperature decreasing 0.7°C per cycle, followed by 23 cycles of 30s at 94°C, 30s at 56°C and 1min at 72°C. Resulting products were run on 4% polyacrylamide sequencing gel at 80 Watts for 2.5 hours.

#### *Silver staining and isolation of cDNA-AFLP fragments*

Gels were silver-stained, dried, and informative fragments were eluted in 5µl of distilled water as described by Chalhoub et al. (1997) and used as the matrix for PCR re-amplification, using the same conditions as in the selective PCR reaction. Then, TDFs (Transcript-Derived Fragments) were fractionated on a 2% agarose gel and purified using a PCR product purification kit (Promega).

#### *Cloning, sequencing and data analysis*

Cloning was performed using the TOPO TA-cloning® kit (Invitrogene, Carlsbad, CA, USA) and purified plasmids were used as the template for sequencing. The sequence reaction was performed with the ABI Prism™ Dye Primer Cycle Sequencing Core Kit from PE applied biosystems (Perkin Elmer), using a Dye IRD 800 Primer M13Forward (5' TGACCGGCAGCAAAAATG 3', MWG biotech, Ebersberg, Germany). Conditions were as recommended by the manufacturer. Sequence analysis was carried out using an automated sequencer Li-Cor 4000 (Li-Cor Inc, Lincoln, Nebraska, USA).

Nucleotide sequences were loaded onto the Infobiogen Resource Centre (<http://www.infobiogen.fr/>) form, for BLAST searching. Score and *E*-value from BLAST-X were considered when determining significant similarities: a score greater than 45 and an *E*-value of less than  $5e^{-4}$ . Sequences were also compared to a maritime pine database (J-M Frigerio, unpublished) using BLAST-N software. Significant matches were obtained for five TDF (Pp.ap12, Pp.ap31, Pp.ap35, Pp.ap37 and Pp.ap41), resulting in longer consensus sequences at the 5' and/or 3'-end.

#### **Characterization of differentially expressed TDFs**

##### *Production of nylon membranes for reverse northern, and data analysis*

Inserts of sequenced cDNA clones were amplified by PCR in 50µl reaction volumes, using 2µM of primers (M13 forward: 5' TGACCGGCAGCAAAAATG 3' and reverse: 5' GGAAACAGCTATGACCATG 3') that were complementary to vector sequences flanking both sides of cDNA inserts. The thermal cycling parameters were 94°C (5 min) followed by 40 cycles of 94°C (45s), 55°C (45s) and 72°C (45s), and a final extension step at 72°C (10min). PCR products were diluted to a final concentration of 5ng/µl, denaturated with NaOH (0.2M final concentration) for 10min, and spotted onto GeneScreen Plus® nylon membrane filters (8x12cm, NEN Life Sciences Products Inc, Boston, MA, USA) using Millipore 96-well dot-blot apparatus. Each clone was replicated on twelve different membranes. Membrane were then baked 1h at 80°C. Controls were spotted at specific positions on the filters, consisting on distilled water and 15 replicates of a cDNA corresponding to a *Pisolithus trinctorius* receptor tyrosine Kinase/Ras (kindly provided by S.

Duplessis, INRA-Nancy, France) as internal quantification standard (not expressed in plant, Arabidopsis Genome Initiative, 2000).

Total RNA used for cDNA-AFLP procedure were used to prepare complex probes from drought stress and control tissues (needles and roots) by reverse transcription using the SMART-PCR cDNA Synthesis Kit (Clontech, Palo Alto, CA, USA). Labelling of the cDNA probes was done in the presence of 50 $\mu$ Ci of [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]dATP and 50 $\mu$ Ci of [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]dCTP using the Prime-it® II Random Primer Labeling kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA) according to the manufacturer's instructions.

Arrayed filters were pre-incubated in a hybridization solution (5X SSC, 5X Denhardt's solution, 0.5%SDS, 500 $\mu$ g/ml shared salmon sperm DNA) for 4h at 65°C. Then the filters were incubated in the same solution with radiolabeled probes at 65°C for 24h. Three replicated filters were hybridized with each of the four probes and washed successively for 5min in 2X SSC, 0.5% SDS at room temperature, 20min in 2X SSC containing 0.1% SDS (65°C), 20min in 1X SSC containing 0.1% SDS (65°C), 20min in 0.5X SSC containing 0.1% SDS (65°C), 40min in 0.1X SSC containing 0.1% SDS (65°C) and then 10min in 0.1% SDS (65°C). Filters were then exposed to Konica medical X-ray film (Tokyo, Japan) for 1 to 3 days.

The raw image were digitalized using the *LabScan* (Amersham-Pharmacia Biotech) software. Detection and quantification of the signals representing hybridized DNA were performed with the *ImageMaster 2D Elite* software version 3.0. (Amersham-Pharmacia Biotech). Interfilters normalization was performed using signal intensities of the receptor tyrosine Kinase/Ras used as a control and spotted at 15 locations on each filter. The intensity  $Y_{if}$  of each spot  $i$  belonging to filter  $f$  was corrected by multiplying  $Y_{if}$  by a linear scaling factor  $K_f$  ( $K_f = Z_{..}/Z_{.f}$ , where  $Z_{..}$  is the mean intensity of all control spots in all filters and  $Z_{.f}$  is the mean intensity of all control spots in filter  $f$ ).

Previous to analysis of variance (ANOVA), the distribution of the corrected spot intensity was normalized by transforming (Log base 10) the data. For each tissue (needles and roots), the effect of the treatment (control *versus* stress) was then tested using the following model:  $Y_{ijk} = \mu + C_j + \epsilon_{ijk}$ , where  $Y_{ijk}$  is the intensity value of the spot  $i$  ( $i = 1-48$ ), in condition  $j$  ( $j = 1-2$ ) for replicate  $k$  ( $k = 1-3$ ),  $\mu$  is the mean intensity of the spot in all conditions,  $C_j$  is the effect of condition  $j$ , and  $\epsilon_{ijk}$  is the residual term.

**Table 1:** Primer pairs used for RT-PCR analysis or for 3'/5'-amplification.

Clone	Size (bp)	Upper primer	Lower primer	Ta (°C)
Pp.rp4	101	GATGCGGAAGCTCTGTTTCA	GCCACCCTGATTTCAGTG	60
Pp.rp33	146	CGATGGCGGTGACAC	CCCCAGTAGTAGTCTCCTCA	55
Pp.rp9	117	AGCAGGGGTGAGAAATGTTT	TCGGCCTCAGTTTGAATGTA	52
Pp.rp19	224	AAAATGACCGGTGCTGTTTC	CGGGCGTCTTTCTCCTTCT	55
Pp.rp18	154	CGGCCTCATAGACATTGT	TTCGCTAGCAGAAGATTTAT	54
Pp.rp20	243	TGCCAATTATAGCTGATACA	TTAGCATGGAGGAGTCATAC	52
Pp.rp23	146	AGCCGCTGGTGTGACTGTT	TTGCTGCCACTTTCCAATCA	55
Pp.rp6	155	CATCGCCACCATCTCT	AGACGCAGTAACAACAGAAC	52
Pp.rp11	243	AAATGCCAGCGAAGGTCT	AGCAATGGCGGAAGAGTCTC	52
Pp.rp2	300	GCCGAGCAGATTGCCTTTC	GCAGCCCTCCAAGACAGATT	60
Pp.rp3	264	AAATGCCCAATTCTCTAAA	GGAGCGAACATGATTATGAA	54
PAL	450	TAGCCAAGAAAACCTGAG	ACTGATAGCGTCGTAAACCA	54
CAD	200	GTCCCCCTTACACTTACAATC	ATCCCCACCACTTCAT	54
4CL	600	CCCCGTCAAATCTGGCTCCT	GGGCGTTACTCTGCACCAC	58
Ubiquitin	476	CAGCAAGCGCATTCAA	ATTCTTCCCTGGCTTTCATA	52 to 60

*Reverse Transcription-PCR analysis*

Total RNA from all experimental conditions in needles were separately DNase RQ1 RNase free (Promega) treated in the presence of RNase inhibitor (RNasin, Promega) and purified through an RNeasy column (Qiagen). Aliquots of 2µg digested total RNA were reverse transcribed, using Superscript II enzyme (Gibco BRL) with anchored oligo-dT, and then diluted four fold. Each step was carried out as described by the manufacturer. PCRs were performed in 50µl of 1X buffer (Gibco BRL) containing 0.1mM dNTPs, 0.2µM of each primer (1 primer pair for ubiquitin and 1 primer pair for the TDF), 2mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5U *Taq* DNA Polymerase (Gibco BRL) and 2µl of diluted single strand cDNA. Amplifications were carried out with the following cycling parameters: preliminary denaturation (4min, 94°C), then denaturation (45s, 94°C), annealing (45s, 52°C to 62°C), extension (1min, 72°C) and final extension (4min, 72°C). The position and length of the primers were chosen according to their thermodynamic parameters using Oligo Primer Software version 4.1 (Rychlik, 1995). The list of primer pairs and their annealing temperatures are presented in Table 2.

A total of 10µl of PCR product were sampled at 15, 20 and 35 cycles. When the final PCR product (35 cycles) showed the expected size based on the sequence information, PCR products corresponding to 15 and 20 cycles were separated by electrophoresis on a 1.2% agarose gel and transferred onto a nylon membrane as described for the northern analysis. Specific probes of the plasmid vector insert were generated by PCR with M13 forward and reverse primers, using the same PCR buffer conditions and thermocycler as described for the RT-PCR. The thermal cycling parameters were 94°C (5 min), followed by 28 cycles of 94°C (45s), 55°C (45s) and 72°C (45s), and a final extension step at 72°C (10min). [<sup>32</sup>P]dATP labeling of amplified insert was performed using the Prime-it® II Random Primer Labeling kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA). Hybridizations were carried out according to membrane manufacturer instructions and then exposed to Konica medical X-ray film (Tokyo, Japan). 16S rRNA was used as a control.

*3'-end RACE cloning*

Amplification of the 3'-end was performed using the kit 3' RACE system for rapid amplification of the cDNA end (Life technologies-Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA). Reverse transcription was carried out using total RNA (5µg) from stressed needles (-0.45MPa) in presence of an adaptor poly(T) tail (AP: 5'

GGCCACGCGTCGACTAGTACTTTTTTTTTTTTTTTTTT 3') using SuperScript™ II reverse transcriptase as described by the manufacturer. The second strand amplification was amplified by PCR (35 cycles of 94°C for 60s, 55°C for 60s, 72°C for 90s, with a final extension at 72°C for 10 min) with the AUAP adapter primer on the poly(A) tail (5' GGCCACGCGTCGACTAGTAC 3') and the 5' proximal primer for Pp.ap1, Pp.ap14, Pp.ap46 and Pp.ap54 (described in the Reverse Transcription-PCR analysis section). The reaction products were purified, cloned and sequenced as described below for the isolation of TDF from silver stained polyacrylamide gel.

#### *5'-end PCR screening of the cDNA library*

An oriented cDNA library constructed in the Uni-Zap® XR vector (Statagene, La Jolla, CA, USA) from non stressed needles was screened. PCR was performed directly on the library using the T3 universal primer (5' AATTAACCCTCACTAAAGGG 3') and the 3' proximal primers for Pp.ap3 and Pp.ap21 (Table 2) with the PCR parameter described for the 3'-end RACE cloning. Reaction products were purified, cloned and sequenced as previously described.

#### **ACKNOWLEDGMENTS**

CD is supported by a Doctoral Scholarship from the French Ministry of Research and Technology.

## REFERENCES

- Arabidopsis Genome Initiative** (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**: 796-815
- Arnon DI** (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts, polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol* **24**: 1-15
- Asaka K** (1996) Radical production and scavenging in the chloroplast. In NR baker ,eds, *Photosynthesis and the environment*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands, pp123-150
- Bachem CWB, Van der Hoeven RS, de Bruijn SM, Vreugdenhil D, Zabeau M, Visser RGF** (1996) Visualisation of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: Analysis of gene expression during potato tuber development. *Plant J* **9**: 745-753
- Barral Y, Jentsch S, Mann C** (1995) G1 cyclin turnover and nutrient uptake are controlled by a common pathway in yeast. *Gene Dev* **9**: 399-409
- Bartholomew DM, Bartley GE, Scolnik PA** (1991) Abscisic acid control of *rbcS* and *cab* transcription in tomato leaves. *Plant Physiol* **96**: 291-296
- Bongue-Baetelsman M, Philips DA** (1995) Nitrogen stress regulates gene expression of enzymes in the flavonoid biosynthetic pathway of tomato. *Plant Physiol Biochem* **33**: 539-546
- Borghetti M, Cinnirella S, Magnani F, Saracino** (1998) Impact of long term drought on xylem embolism and growth in *Pinus halepensis* Mill. *Trees* **12**: 187-195
- Bouchez D, Höfte H** (1998) Functional genomics in plants. *Plant Physiol* **118**: 725-732
- Brendel O, Pot D, Plomion C, Rozenberg P, Guehl JM** (2002) Genetic parameters and QTL analysis of  $\delta^{13}\text{C}$  and ring width in maritime pine. *Plant Cell Env* (in press)
- Chagné D, Lalanne C , Madur D, Kumar S, Frigerio J-M, Krier C, Decroocq S, Savouré A, Bou Dagher-Kharrat M, Bertocchi E, Brach J, Plomion C** (2002) A high density linkage map of *Pinus pinaster* based on AFLPs. *Ann For Sci* (in press)
- Chalhoub BA, Thibault S, Laucou V, Rameau C, Höfte H, Cousin R** (1997) Silver staining and recovery of AFLP amplification products on large denaturing polyacrylamide gel. *BioTechniques* **22**: 216-220
- Chang S, Puryear J, Cairney J** (1993) A simple and efficient method for Isolating RNA from pine trees. *Plant Mol Biol Rep* **11**: 113-116
- Chang S, Puryear J, Cairney J** (1995) Gene expression under water deficit in loblolly pine (*Pinus tarda* L): Isolation and characterization of cDNA clones. *Physiol Plant* **95**: 139-148

- Chapman DJ, Barber DJ** (1987) Polar lipids of chloroplast membranes. *Method Enzymol* **148**: 294-319
- Costa P** (1999) Réponse moléculaire, physiologique et génétique du pin maritime à une contrainte hydrique. PhD thesis. Université Henri Poincaré, Nancy
- Costa P, Bahrman N, Frigerio J-M, Kremer A, Plomion C** (1998) Water-deficit-responsive proteins in maritime pine. *Plant Mol Biol* **38**: 587-596
- Cui YX, Bell AA, Joost O, Margill C** (2000) Expression of potential defense response genes in cotton. *Physiol Mol Plant Pathol* **56**: 25-31
- Cushman JC, Bohnert H** (2000) Genomic approaches to plant stress tolerance. *Cur Opin Plant Biol* **3**: 117-124
- D'Agostino IB, Kieber JJ** (1999) Molecular mechanisms of cytokinin action. *Curr Opin Plant Biol* **2**: 359-364
- Douce R, Joyard J** (1996). Biosynthesis of thylakoid membrane lipids. In DR Ort, CF Yocum, eds, *Advances in Photosynthesis, Vol 4: Oxygenic Photosynthesis: The Light Reactions*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, 69-101
- Dubos C, Plomion C** (2001a) Drought differentially affects expression of a PR-10 protein, in needles of maritime pine (*Pinus pinaster* Ait) seedlings. *J Exp Bot* **358**: 1143-1144
- Dubos C, Plomion C** (2001b) Identification of water-deficit responsive genes in maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.) roots using non radioactive cDNA-AFLP. *Plant Mol Biol* **in press**
- Duff SMG, Sarath G, Plaxton WC** (1994) The role of acid phosphatases in plant phosphorus metabolism. *Physiol Plant* **90**: 791-800
- Fernandez M, Gil L, Pardos JA** (2000) Effects of water supply on gas exchange in *Pinus pinaster* Ait. provenances during their first growing season. *Ann For Sci* **57**: 9-16
- Gamas P, Niebel F de C, Lescure N, Cullimore J** (1996) Use of a subtractive hybridization approach to identify new *Medicago truncatula* genes induced during root nodule development. *Mol Plant Microbe Interact* **9**: 233-242
- Geigenberger P, Reimholz R, Deiting U, Sonnewald U, Stitt M** (1999) Decrease expression of sucrose phosphate synthase strongly inhibits the water stress-induced synthesis of sucrose in growing potato tubers. *Plant J* **19**: 119-129
- Gibbs J, Morrell S, Valdez A, Setter TL, Greenway H** (2000) Regulation of alcoholic fermentation in coleoptiles of two rice cultivars differing in tolerance to anoxia. *J Exp Bot* **51**: 785-796
- Gilmore A, Ball M** (2000) Protection and storage of chlorophyll in overwintering evergreens. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 11098-11101



- Goldberg R, Morvan C, Jauneau A, Jarvis MC** (1996) Methyl-esterification, de-esterification and gelation of pectins in the primary cell wall. In: Visser J, Voragen AGJ (eds) Pectins and pectinases. Elsevier, Amsterdam, pp 151-171
- Harms K, Ramirez I, Pena-Cortez H** (1998) Inhibition of wound-induced accumulation of allene oxide synthase transcripts in flax leaves by aspirin and salicylic acid. *Plant Physiol* **118**: 1057-1065
- Hartzog GA, Basrai MA, Ricupero-Hovasse SL, Hieter P, Winston F** (1996) Identification and analysis of a functional human homolog of the SPT4 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **16**: 2848-2856
- He ZH, Cheeseman I, He DZ, Kohorn BD** (1999) A cluster of five cell wall-associated receptor kinase genes, Wak 1-5, are expressed in specific organs of *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol* **39**: 1189-1196
- He ZH, Fujiki M, Kohorn BD** (1996) A cell wall-associated, receptor-like protein kinase. *J Biol Chem* **271**: 19789-19793
- Heape MA, Juguelin H, Boiron F, Cassagne C** (1985) Improved one-dimensional thin layer chromatographic technique for polar lipids. *J Chrom* **322**: 391-395
- Hesse H, Willmitzer L** (1996) Expression analysis of a sucrose synthase gene from sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Plant Mol Biol* **30**: 863-872
- Hincha DK, Meins F Jr, Schmitt JM** (1997) Beta-1,3-glucanase is cryoprotective *in vitro* and is accumulated in leaves during cold acclimation. *Plant Physiol* **114**: 1077-1083
- Hughes L** (2000) Biological consequences of global warming: is the signal already. *Trends Ecol Evol* **15**: 56-61
- Ingram J, Bartels D** (1996) The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **47**: 377-403
- Iuchi S, Yamaguchi-Shinozaki K, Urao T, Terao T, Shinozaki K** (1996) Novel drought-inducible genes in the highly drought-tolerant cowpea: cloning of cDNA and analysis of the expression of the corresponding genes. *Plant Cell Physiol* **37**: 1073-1082
- Jarvis SB, Taylor, MA, Bianco J, Corbineau F, Davies HV** (1996) Dormancy-breakage in seeds of Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco). Support for the hypothesis that LEA gene expression is essential for this process. *J Plant Physiol* **151**: 457-464
- Jacobsen SE, Running MP, Meyerowitz EM** (1999) Disruption of an helicase/RNase III gene in *Arabidopsis* causes unregulated cell division in floral meristems. *Development* **126**: 5231-5243

- Jagtap V, Bhargava S, Streb P, Feierabend J** (1998) Comparative effect of water, heat and light stresses on photosynthetic reactions in *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *J Exp Bot* **49**: 1715-1721
- Kaltenbach M, Schroder G, Schmelzer E, Lutz V, Schroder J** (1999) Flavonoid hydroxylase from *Catharanthus roseus*: cDNA, heterologous expression, enzyme properties and cell-type specific expression in plants. *Plant J* **19**: 183-193
- Kennedy BF, Filippis LF** (1999) Physiological and oxidative response to NaCl of the salt tolerant *Grevillea ilicifolia* and salt sensitive *Grevillea arenaria*. *J Plant Physiol* **155**: 746-754
- Kinlaw CS, Neale DB** (1997) Complex gene families in pine genomes. *Trends Plant Sci* **2**: 356-359.
- Kleines M, Elster R-C, Rodrigo M-J, Blervacq A-S, Salamini F, Bartels D** (1999) Isolation and expression analysis of two stress-responsive sucrose-synthase genes from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* (Hochst.). *Planta* **209**: 13-24
- Kotilainen M, Helariutta Y, Mehto M, Pollanen E, Albert VA, Elomaa P, Teeri TH** (1999) GEG participates in the regulation of cell and organ shape during corolla and carpel development in *Gerbera hybrida*. *Plant Cell* **11**: 1093-1104
- Kyrpides NC, Woese CR** (1998) Universally conserved translation initiation factors. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 224-228
- Laudert D, Pfannschmidt U, Lottspeich F, Hollander-Czytko H, Weiler EW** (1996) Cloning, molecular and functional characterization of *Arabidopsis thaliana* allene oxide synthase (CYP74), the first enzyme of the octodecanoid pathway to jasmonates. *Plant Mol Biol* **31**: 323-335
- Lichtenthaler HK** (1998) The stress concept in plants: an introduction. *Ann NY Acad Sci* **851**: 187-198
- Liljenberg CS** (1992) The effects of water deficit stress on plant membrane lipids. *Prog Lipid Res* **31**: 335-343
- Marcote MJ, Gu F, Gruenberg J, Aniento F** (2000) Membrane transport in the endocytic pathway: animal versus plant cells. *Protoplasma* **210**: 123-132
- Maucher H, Hause B, Feussner I, Ziegler J, Wasternack C** (2000) Allene oxide synthase of barley (*Hordeum vulgare* cv Salome): tissue specific regulation in seedling development. *Plant J* **21**: 199-213
- Mayne MB, Coleman JR, Blumwald E** (1996) Differential expression during drought conditioning of a root-specific S-adenosylmethionine synthetase from jack pine (*Pinus banksiana* Lamb.) seedlings. *Plant Cell Env* **19**: 958-966

- Moldonado CA, Zuñiga GE, Corcuera LJ, Alberdi M** (1997) Effect of water stress on frost resistance of oat leaves. *Env Exp Bot* **38**: 99-107
- Moons A, Prinsen E, Bauw G, Montagu Mv** (1997) Antagonist effects of abscisic acid and jasmonates on salt stress-inducible transcripts in rice roots. *Plant Cell* **9**: 2243-2259.
- Munné-Bosch S, Schwarz K, Alegre L** (1999) Enhanced formation of alpha-tocopherol and highly oxidized abietane diterpenes in water stressed rosemary plants . *Plant physiol* **121**: 1047-1052
- Nelson DE, Rammesmayr G, Bohnert HJ** (1998) Regulation of cell-specific inositol metabolism and transport in plant salinity tolerance. *Plant Cell* **10**: 753-764
- Nguyen A, Lamant A** (1989) Variation in growth and osmotic regulation of roots of water-stressed maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.) provenances. *Tree Physiol* **5**: 123-133
- Ning Li F, Johnston M** (1997) Grr1 of *Saccharomyces cerevisiae* is connected to the ubiquitin proteolysis machinery through Skp1: coupling glucose sensing to gene expression and the cell cycle. *EMBO J* **16**: 5629-5638
- Okushima Y, Koizumi N, Kusano T, Sano H** (2000) Secreted proteins of tobacco cultured BY2 cells: identification of a new member of pathogenesis-related proteins. *Plant Mol Biol* **42**: 479-488
- Padmanabhan V, Dias DMAL, Newton RJ** (1997) Expression analysis of a gene family in loblolly pine (*Pinus taeda* L) induced by water deficit stress. *Plant Mol Biol* **35**: 801-807
- Pan L, Kawai M, Yano A, Uchimiya H** (2000) Nucleoside diphosphate kinase required for coleoptile elongation in rice. *Plant Physiol* **122**: 447-452
- Pan S** (1987) Characterization of multiple acid phosphatase in salt stressed spinach leaves. *Aust J Plant Physiol* **14**: 117-124
- Pell EJ, Schlagnhauser CD, Artica RN** (1997) Ozone-induced oxidative stress: mechanisms of action and reaction. *Physiol Plant* **100**: 264-273.
- Plomion C, Hurme P, Frigerio J-M, Ridolphi M, Pot D, Pionneau C, Avila C, Gallardo F, David H, Neutlings G, Campbell M, Canovas FM, Savolainen O, Bodénès C, Kremer A** (1999) Developing SSCP markers in two *Pinus* species. *Mol Breed* **5**: 21-31
- Prioul JL, Quarrie S, Causse M, de Vienne D** (1997) Dissecting complex physiological functions through the use of molecular quantitative genetics. *J Exp Bot* **48**: 1151-1163
- Pflieger S, Lefebvre V, Causse M** (2001) The candidate gene approach in plant genetics: a review. *Mol Breed* **7**: 275-291
- Riccardi F, Gazeau P, de Vienne D, Zivy M** (1998) Protein changes in response to progressive water deficit in maize. *Plant Physiol* **117**: 1253-1263

- Richard S, Morency MJ, Drevet C, Jouanin L, Seguin A** (2000) Isolation and characterization of a dehydrin gene from white spruce induced upon wounding, drought and cold stresses. *Plant Mol Biol* **43**: 1-10
- Rychlik W** (1995) Priming efficiency in PCR. *BioTechniques* **18**: 84-89
- Seillac** (1960) Contribution à l'étude de la nutrition du pin maritime : variation saisonnières de la teneur des pseudophylles en azote, potassium et acide phosphorique. PhD thesis. Université de Bordeaux, Bordeaux
- Sembdner G, Parthier B** (1993) Biochemistry, physiological and molecular actions of jasmonates. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **44**: 569-589
- Shi LF, Gast RT, Manjula G, Olszewski NE** (1992) Characterization of a shoot-specific, GA- and ABA-regulated gene from tomato. *Plant J* **2**: 153-159
- Shi LF, Olszewski NE** (1998) Gibberellin and abscisic acid regulate GAST1 expression at the level of transcription. *Plant Mol Biol* **38**: 1053-1060
- Shih CY, Kao CH** (1998) Induction of acid phosphatase in detached rice leaves under stress conditions. *Bot Bul Acad Sinica* **39**: 26-32
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (1996) Molecular responses to drought and cold stress. *Curr Opin Biotechnol* **7**:161-7
- Stegg P, Bevilaqua G, Kopper L, Thorgeisson UP, Talmadge JE, Liotta LA, Sobel ME** (1988) Evidence for a novel gene associated with low tumor metastatic potential. *J Natl Cancer Inst* **80**: 200-204
- Sutinen ML, Repo T, Sutinen S, Lasarov H, Alvila L, Pakkanen TT** (2000) Physiological changes in *Pinus sylvestris* needles during early spring under sub-arctic conditions. *For Ecol Manag* **135**: 217-228
- Teramoto H, Momotani E, Takeba G, Tsuji H** (1994) Isolation of a cDNA clone for a cytokinin-repressed gene in excised cucumber cotyledons. *Planta* **193**: 573-579
- Triboulot M-B** (1996) Effets du stress osmotique et de la carence en potassium sur la croissance racinaire du pin maritime. Etude biomécanique du grandissement cellulaire. PhD thesis. Université Henri Poincaré, Nancy
- Vernon DM, Bohnert HJ** (1992) A novel methyl transferase induced by osmotic stress in the facultative halophyte *Mesembryanthemum crystallinum*. *EMBO J* **11**: 2077-2085
- Voelker R, Mendel-Hartvig J, Barkan A** (1997) Transposon-disruption of a maize nuclear gene, *tha 1*, encoding a chloroplast SecA homologue: in-vivo role of cp-SecA in thylakoid protein targeting. *Genetics* **145**: 467-478

- Vogeli-Lange R, Frundt C, Hart CM, Nagy F, Meins FJr** (1994) Developmental, hormonal, and pathogenesis-related regulation of the tobacco class I beta-1,3-glucanase B promoter. *Plant Mol Biol* **25**: 299-311
- Volaire F, Thomas H** (1995) Effects of drought on water relations, mineral uptake, water-soluble carbohydrate accumulation and survival of two contrasting populations of cocksfoot (*Dactylis glomerata* L.). *Ann Bot* **75**: 513-524
- Wang C, Avdiushko S, Hildebrand DF** (1999) Overexpression of a cytoplasm-localized allene oxide synthase promotes the wound-induced accumulation of jasmonic acid in transgenic tobacco. *Plant Mol Biol* **40**, 783-793
- Wang PDO, Shoseyov O, Altman A** (1995) Characterization of BspA, a major-boiling stable, water-stress-responsive protein in aspen (*Populus tremula*). *Tree Physiol* **15**: 566-571
- Wang PDO, Shoseyov O, Altman A, Bartels D** (1997) Differential accumulation of water-stress related proteins, sucrose synthase and soluble sugars in *Populus* genotypes which differ in their water-stress response. *Physiol Plant* **99**: 153-159
- Yang ZM, Zheng SJ, Hu AT, Zheng YT, Yan JY** (2000) Response of cucumber plants to increased UV-B radiation under water stress. *J Env Sci* **12**: 236-240
- Zeng Y, Wu Y, Avigne WT, Koch KE** (1998) Differential regulation of sugar-sensitive sucrose synthases by hypoxia and anoxia indicate complementary transcriptional and post-transcriptional responses. *Plant Physiol* **116**: 1573-1583
- Zhang Y, Sederoff RR, Allona I** (2000) Differential expression of genes encoding cell wall proteins in vascular tissues from vertical and bent loblolly pine trees. *Tree Physiol* **20**: 457-466
- Zuniga GE, Fernandez J, Cristi R, Alberdi M** (1990) Lipid changes in Barley seedlings subjected to water and cold stress. *Phytochem* **29**: 3087-3090.

### Publication 3

#### **Drought differentially affects expression of a PR-10 protein, in needles of maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.) seedlings**

Dans cette partie nous nous sommes focalisés sur un gène codant pour une *pathogenesis related protein* (PR-10), dont la régulation avait déjà été observée chez une autre espèce de conifère soumise au froid. La séquence complète de l'ADNc de ce gène a été isolée à partir des aiguilles de plantules de pin maritime stressées. La protéine correspondante comporte 150 acides aminés, a une masse moléculaire de 16,7 kDa et un point isoélectrique estimé à 5,28. Nous avons montré que le niveau d'accumulation de ce transcrit été induit de manière transitoire dans les aiguilles des plants stressés. Par ailleurs, aucune expression de ce gène n'a été détectée dans les racines et les tiges.

**Drought differentially affects expression of a PR-10 protein,  
in needles of maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.) seedlings**

CHRISTIAN DUBOS AND CHRISTOPHE PLOMION

Equipe de Génétique et Amélioration des Arbres Forestiers, INRA Pierroton, BP 45, 33610  
Cestas, France.

Correspondance: C. Plomion

Tel: +33-5-57-97-90-76

Fax: +33-5-57-97-90-88

E-mail: [plomion@pierroton.inra.fr](mailto:plomion@pierroton.inra.fr)

**Accepté** : Journal of Experimental Botany, Vol. 52, No. 358, pp. 1-2, May 2001

**ABSTRACT**

A full length cDNA encoding a PR-10 protein was isolated from maritime pine drought stressed seedlings. The predicted protein contained 150 amino acids, has a molecular mass of 16.7 kDa and an isoelectric point of 5.28. The transcript level of PR-10 displayed a transient accumulation in needles of drought stressed plants, and was not detectable in root and stem tissues.

Key words: Drought, *Pinus pinaster*, PR-10.



```

          *          20          *          40          *          6
Panax      : -GVQKTEVEATSTVPAQKLYAGLLLIDIDDILPKAFP-PAI-KSSEIIEGDGGVGTVKLVLT : 57
Lupinus    : -GIFTFEDESTSTVAPAKLYKALVADANIIIPKAV-PAI-QS-ENVEGNGGPGTIKKLT : 57
Pseudotsug : -VSGTSSTEEVVCQVEARRLWTAMVKDSDHNLLPKVLP-PIF-AS-TCHQGDGGVGTIKQLN : 58
Pinus      : -VSGTSSTEEVVCQVEARRLWNATTKDSDHNFLPKVLP-PIF-TS-TLQGDGGVGTVKQLN : 58
Picea-2    : -VSRTAITEDVCQVEAKRLWNALSKDSDHNLLPKILP-PIF-AS-TLQGDGGVGTIKQLN : 58
Picea-1    : -VK-----LGHNLYPKALH-PIF-AS-TLQGDGGVGTVRQLN : 37
Pp.ap11    : -VSGSKEI-----MERPGEGQPQPPPKVFPDFI-SS-TFQGDGGVGTIKQLN : 47

          0          *          80          *          100          *          1
Panax      : LGEAS-QENTMKQRIQALDKDAITYTYSIITGGDILLDITLESIVNHFTIVPTPDGGSIVK : 115
Lupinus    : -IEDG-ETKIVLHKIEEIDEANLGNYSIVGGVGLPDTVEKITFETRLVEGVNNGSGIKG : 115
Pseudotsug : -TPGNKDESFVKERVDEIDEGKIVYKYTTIEGGS LGKKLSSAS-PEV-IVPRKEGGCVAS : 117
Pinus      : -TPGKKDESEIKERVDELDQENFVYKYTAIEGGPLGKQLSSAS-PEV-LIIPRKEGGCVAR : 117
Picea-2    : -TPANKDESEIKERVDEIDEEKIVYKYTTIEGGS LGKLSAAS-PEV-LVPRKEGGCVAS : 117
Picea-1    : -TPANKDESEVKERLDVIDEDNMVHKYAAIEGGS LGKLSALN-PEL-FVHREEGGCALT : 96
Pp.ap11    : -TPANKDESEVAKERVDEMDEKIVYKYTTIEGGL LGKLSASN-PEL-FVPRKEGGCVVT : 106

          20          *          140          *          160
Panax      : NNTI-NTIIGD-VIPEENIKDATEKAGL-PAKAVEAYL-PA----- : 154
Lupinus    : VTIKI-ITKGD-KPNEQEGKAA-ARGDAFFKAIETYLSAH-DYN-- : 158
Pseudotsug : WVCN-ETIIPG-QLDEEAKAKEIKENSIGMLKKIEQYL-SNENLYC- : 161
Pinus      : WTCN-ETIIPG-QPDEGKLEIKEDSFGMLKKVEQYL-SNENLYC- : 161
Picea-2    : WICN-ETIIPG-QLDEGKTKEIKENSIA-MLKKIEQYL-SNENLYC- : 161
Picea-1    : WICN-ETIIPG-PDGETRVEEIKKMDDA-FFKKIEEYL-SNEDLYC- : 140
Pp.ap11    : WICN-ETIIPG-PVDEGKAQEMKEQSNV-FFKKMEQYL-SNITLYC- : 150

```

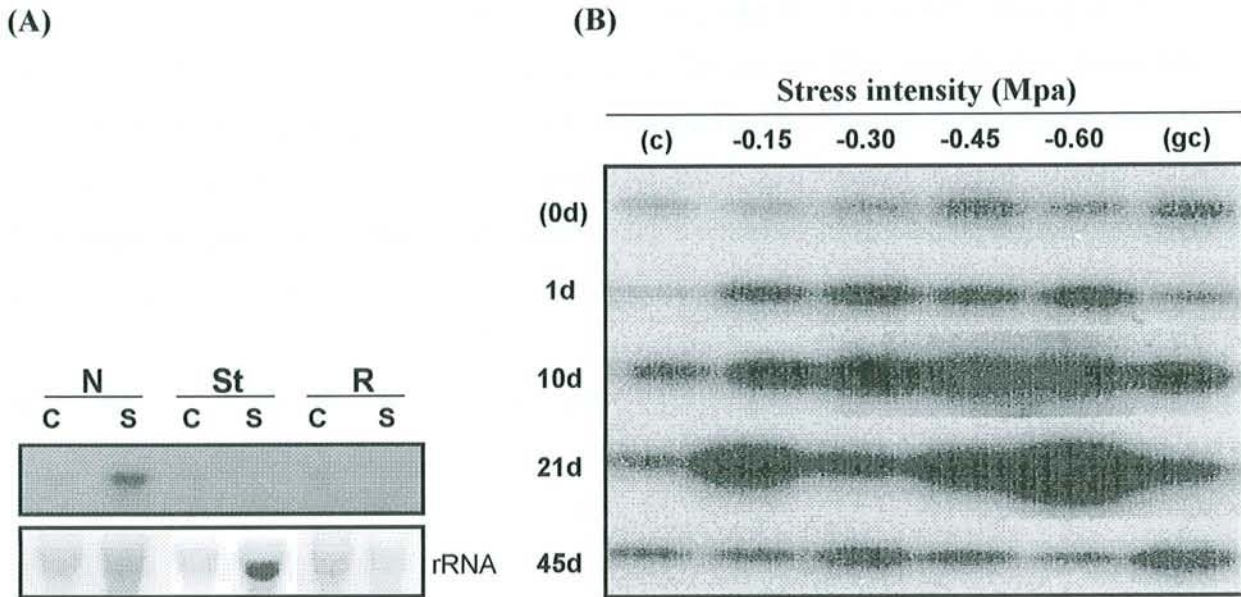
**Fig. 1.** Amino acid sequence alignment of Pp.ap11 (AJ291767) protein with its orthologues from *Lupinus albus* (AJ000108), *Picea glauca* (AAF12810, n°1 and AAF12812, n°2), *Pinus monticola* (AAC33531), *Pseudotsuga menziesii* (AAF60972) and ribonuclease from *Panax ginseng* (P80890). Multiple alignment was done using Clustal-W. Dashes indicate gaps introduced to maximise the alignment. Identical and similar residues are shaded.

The pathogenesis related (PR) protein gene family, has been described as responding to biotic and abiotic stresses (e.g. cold, ozone, salt, or heavy metal), and to different hormones such as ethylene, cytokinin or salicylic acid (Pääkkönen *et al.*, 1998 ; Kitajima and Sato, 1999). The intra cellular PR-10 subset was recently found in conifers as cold stress regulated (Ekramoddoullah *et al.*, 2000). The metabolic function of PR-10 was characterized with recombinant protein of *Lupinus albus*, as presenting a ribonuclease activity against several RNA preparations (Bantignies *et al.*, 2000).

A cDNA fragment (528 bp) with homology to PR-10 was identified in a differential screen (cDNA-AFLP, Bachem *et al.*, 1996) for genes of which the mRNA level was altered upon drought stress (C Dubos, unpublished results). 3'-end rapid amplification of cDNA (3' RACE system for rapid amplification of cDNA ends kit, Life technologies-Gibco BRL) using total drought stressed needles RNA and a gene-specific 5' primer, was used to generate the cDNA fragment corresponding to the 3'end of this gene. The 5'-end sequence was obtained by PCR, using an oriented drought stressed needle cDNA library (Uni-Zap<sup>®</sup> XR vector, Statagene) and the universal T7 primer, in combination with a gene-specific 3' primer. Both 5' and 3' sequences matched to the cDNA-AFLP fragment, and made it possible to obtain a full length cDNA (designated as Pp.ap11, accession AJ291767) of 857bp.

Pp.ap11 has a putative open reading frame of 450 bp encoding a 150 amino acids protein. The protein presented a predicted molecular mass of 16.7 kDa and an isoelectric point of 5.28. Database sequence analysis using BlastX showed that Pp.ap11 was similar to the root cold-induced PR-10 protein of *Picea glauca* (AAF12812), with 75% and 86% of amino acids identity and similarity, respectively. Multiple alignment of amino acid sequences showed that Pp.ap11 shared the Bet v 1 conserved domain with other conifer PR-10 and ribonuclease class-2, (Gajhede *et al.*, 1996). Bet v 1 contains a P-loop domain GxGGxG involved in the binding of phosphate group of RNA, that is more conserved in conifers (GDGGVG motif, Fig.1) compared to the other PR-10 or ribonuclease class-2 proteins. The protein sequence of Pp.ap11 and the *Picea glauca* PR-10 (AAF12810) were shorter in their N-terminal compared to the other PR-10.

The expression of the maritime pine PR-10 protein was examined in hydroponically drought stressed seedlings. After sterilization, *Pinus pinaster* seeds were placed on moistened filter paper for germination. Seedlings were then transferred to an aerated nutrient solution (Nguyen and Lamant, 1989). After three weeks of growth, seedlings were placed in a drought stressed medium (-0.45 MPa) using polyethylene glycol (PEG 3350) as osmoticum. The expression of Pp.ap11 was analysed on three tissues (needle, stem and root). While the



**Fig. 2.** Northern hybridization (A) and time course RT-PCR analysis (B) of *Pp.ap11*. (A) Total RNA was extracted from needles (N), stems (St) and roots (R) of 6 weeks old seedlings after 21 days of treatment; (C) control and (S) stressed condition. 10 $\mu$ g total RNA was separated on 1.2% (w/v) agarose/1% (w/v) formaldehyde gel and transferred onto a nylon membrane. Hybridization with [<sup>32</sup>P]dCTP-labelled probe, from *Pp.ap11* cDNA-AFLP fragment, was carried out at 65°C in 6X SSC, 5X Denhardt and 0.5% SDS buffer. Finally, the membrane was exposed to autoradiographic film for 3 days at -80°C with screen. The amount of RNA was determined using ethidium bromide stained ribosomal RNA. (B) For each experimental condition, 2 $\mu$ g DNase digested and purified total RNA was reverse transcribed with anchored oligo-dT, and diluted 4 fold. PCR was done with specific *Pp.ap11* and ubiquitin control primers. 10 $\mu$ l of PCR product were sampled at 15 cycles and separated by electrophoresis in 1,2% (w/v) agarose gel and transferred onto a nylon membrane. Probe and hybridization were done as described for the Northern. Samples corresponding to “0d” (i.e. before the stress was applied), “c” (i.e. a non stressed hydroponic medium), “gc” (i.e. a well watered ground medium) were used as control.

transcript of this gene was detected in needle, no hybridisation signal was found in root and stem, indicating that its over-expression was tissue specific (Fig. 2.A). The absence of expression in root was also verified using RT-PCR, a more sensitive method.

To further characterize the maritime pine PR-10, the time depending expression of Pp.ap11 was analysed on needles of 5 groups of seedlings: one used as a control was raised in growing solution without PEG (-0.08 MPa) and the other were raised in four drought stressed conditions obtained by increasing level of PEG (-0.15, -0.30, -0.45 and -0.60 MPa). A time course expression analysis was performed considering five points: just prior stress application and 1, 10, 21 and 45 days after the treatment started (Fig. 2.B). Another group of unstressed plants was raised in the ground, and was used as a second control for each sampling date. Total RNA was used for RT-PCR experiments. Pp.ap11 was similarly expressed in the two control treatments showing that the hydroponic solution did not affect gene expression. It was gradually over-expressed in needles of all stressed conditions from 1 to 21 days and returned to a low level at 45 days. In addition to this transient over-expression, the transcript level was dose-stress dependent, increasing from -0.15 to -0.60 MPa. Muramoto *et al.*, (1999) reported the over-expression of ribonuclease gene in salt stressed barley leaves, and suggested a remobilization of nucleotides or phosphate for the benefit of fresh organs. Interestingly, Pp.ap11 was always present at a low level in the controls, indicating a minimum expression level for this gene. Under drought stress, the expression of Pp.ap11 was enhanced, similarly to what Muramoto *et al.*, (1999) described in barley, which could suggest the involvement of the maritime pine PR-10 ribonuclease in the transcript turn-over.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

CD is supported by fellowship from Ministère de la Recherche et de la Technologie. We acknowledge fundings from European Union (INCO-IC18-CT97-0200), Région Aquitaine and INRA (ECOGENE n°92). We thank Raül Herrera for helpful comments.

## **REFERENCES**

Bachem CWB, Van der Hoeven RS, de Bruijn SM, Vreugdenhil D, Zabeau M, Visser RGF. 1996. Visualisation of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: Analysis of gene expression during potato tuber development. *Plant Journal* 9, 745-53.

- Bantignies B, Seguin J, Muzac I, Dedaldechamp F, Gulick P, Ibrahim R. 2000. Direct evidence for ribonucleolytic activity of a PR-10-like protein from white lupin roots. *Plant Molecular Biology* 42, 871-81.
- Ekramoddoullah AKM, Yu X, Sturrock R, Zamani A, Taylor D. 2000. Detection and seasonal expression pattern of a pathogenesis-related protein (PR-10) in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) tissues. *Physiologia Plantarum* 110, 240-47.
- Gajhede M, Osmark P, Poulsen FM, Ipsen H, Larsen JN, Joost van Neerven RJ, Schou C, Lowenstein H, Spangfort MD. 1996. X-ray and NMR structure of Bet v 1, the origin of birch pollen allergy. *Nature Structural Biology* 3, 1040-45.
- Kitajima S, Sato F. 1999. Plant pathogenesis-related proteins: molecular mechanisms of gene expression and protein function. *Journal of Biochemistry* 125, 1-8.
- Muramoto Y, Watanabe A, Nakamura T, Takabe T. 1999. Enhanced expression of a nuclease gene in leaves of barley plants under salt stress. *Gene* 234, 315-21.
- Nguyen A, Lamant A. 1989. Variation in growth and osmotic regulation of roots of water-stressed maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.) provenances. *Tree physiology* 5, 123-33.
- Pääkkönen E, Seppänen S, Holopainen T, Kokko H, Kärenlampi S, Kärenlampi L, Kangasjärvi J. 1998. Induction of genes for the stress proteins PR-10 and PAL in relation to growth, visible injuries and stomatal conductance in birch (*Betula pendula*) clones exposed to ozone and/or drought. *New phytologist* 138, 295-305.

## Publication 4

### **Maritime pine histones: characterization and expression patterns in drought stressed seedlings**

Les protéines histones sont impliquées dans la compaction de l'ADN et dans la régulation de la transcription. Des études ont également montré leur implication (notamment pour l'histone H1), dans la réponse au stress hydrique chez les végétaux. Dans un premier temps, nous présentons dans les séquences complètes de l'ADNc de sept gènes appartenant aux cinq classes d'histones : H1, H2A (deux variants), H2B (deux variants), H3 et H4. Dans un second temps, nous décrivons leurs profils d'expression dans les aiguilles, les tiges et les racines de jeunes plantules de pin maritime ayant ou non subi un déficit d'alimentation en eau.

**Maritime pine histones: characterization and expression patterns in  
drought stressed seedlings**

CHRISTIAN DUBOS<sup>1</sup>, RAUL HERRERA<sup>2</sup> AND CHRISTOPHE PLOMION<sup>1</sup>

1/Equipe de Génétique et Amélioration des Arbres Forestiers, INRA Pierroton, BP 45, 33610 Cestas, France.

2/Insituto Biologia Vegetal y Biotecnologia, Universidad de Talca, 2 Norte 685, Talca, Chile.

Correspondence: C. Plomion

Tel: +33-5-57-97-90-76

Fax:+33-5-57-97-90-88

E-mail: [plomion@pierroton.inra.fr](mailto:plomion@pierroton.inra.fr)

**En préparation.**

---

## INTRODUCTION

The molecular and biochemical mechanisms of plants faced to drought have been widely documented in crops as well as in model species (reviewed by Ingram and Bartels, 1996; Cushman and Bohnert, 2000). Despite their importance in the functioning of the ecosystem, such studies remain scarce in forest trees, particularly in conifers. In the few studies published so far, the commonly reported cellular mechanisms induced by drought (osmotic adjustment, reactive oxygen scavenging, cell wall reinforcement) were also found in these long-lived organisms (Chang et al., 1995; Mayne et al., 1996; Padmanabhan et al., 1997; Costa et al., 1998; Dubos and Plomion, 2001a). In addition to induction of transcription of specific genes, drought stress also results in the repression of transcription of other genes. Histones play a important role in this regulation mechanism. Histones, belong to a highly conserved gene family (Collart et al., 1992). In the nucleus, histones interact with chromatin, forming an octameric complex structure. Octamers are basic repeating structural units (composed by two histone H2A/H2B dimers and one H3/H4 tetramer) corresponding to the nucleosome core (Luger et al, 1997). A higher organization structure which bind nucleosome cores is promoted *via* linker histones: H1 and H5 (Ramakrishnan, 1997). A well conserved tripartite structure, was found for all studied histone genes, comprising two-tail domains (C- and N-terminal) and one more conserved central part. Tails were shown not to be involved in maintaining the structural integrity of the nucleosome, but to be essential for the condensation of the chromatin, by interacting with other histone and non-histone chromosomal proteins.

Interestingly, expression analysis of variant subclasses for each histone revealed a tissue-, developmental stage- and/or stress-specific expression, indicating a specialized function for each type of variant (Sullivan et al, 2000). For a given stress, up- and down-regulation of particular histone variants have been also found. This result can be explained by the duality of histone proteins. On the one hand, the amount of histones is correlated with DNA content. Indeed, histones are highly expressed in organs containing meristematic cells (Koshland and Strunnikov, 1996; van den Heuvel et al., 1999). Growth inhibition induced by stresses decreases the cell cycle activity. Hence, expression of histone is down-regulated in such organ. For exemple, Thoiron and Briat (1999) reported a transcription decrease of histone H1 in maize submitted to iron deficiency. On the other hand, other histone variants can be over-expressed in drought stress plants. This behavior can result from two processes. First, it is well known that histone oligomerisation plays a fundamental role in the DNA packaging. By



limiting DNA accessibility (Spencer and Davie, 1999) histones are implicated in the general repression of gene expression. In wheat and maize Schultz et al. (1996) showed that histone linker H1 enhanced DNA binding activity and regulated gene expression. In *Lycopersicum* species, histone H1 was found to show a rapid accumulation during salt and osmotic (polyethylene glycol) stresses (Bray et al 1999). It was also found to be over-expressed in both *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus* leaves subjected to drought (Ascenzi and Gantt, 1999a; Deuleu et al, 1999). Second, histone over-expression in drought-stress plants can result from the early cell cycle activation in root meristem: i.e. enhancement of root growth to maintain sufficient water up-take. In *Arabidopsis thaliana* four different linker histone H1 variants were found, from which only one (H1-3) was highly expressed in meristematic cells and elongation zone in drought-stressed roots (Ascenzi and Gantt, 1997; Ascenzi and Gantt, 1999b).

Histones have been deeply studied from bacteria to mammals, and fully described in crop plants. However, histone regulation in trees faced to drought stress, remain largely unknown. In a previous experiment (Dubos et Plomion, 2001b), we reported for the down-regulation of histone H2B in the roots of maritime pine seedlings submitted to a prolonged drought. In this article, we report on the cloning of the full-coding sequences of five classes of histone in maritime pine (H1, H2A, H2B, H3 and H4) and compare their expression patterns in needles, stems and roots of non-stressed and drought stressed seedlings.

## MATERIAL AND METHODS

### Plant material

*Pinus pinaster* seeds were 15min sterilized (30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), 24h imbibed in sterile water, and then placed on moistened filter paper for 10 days germination. Homogenous seedlings were transferred to an aerated nutrient solution (N'Guyen and Lamant, 1989) for three weeks of growth. Polyethylene glycol (PEG 3350, Sigma) drought stress treatment was then applied to half of the seedlings by lowering the osmotic potential to -0.45 MPa. Seedlings growing in Seillac medium without PEG (-0.08 MPa) were used as a control treatment. Six week old seedlings from both conditions were finally sampled, immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until use. Growth chamber conditions were 16/8h light/dark regime, 24/18°C temperature, 45/70% hygrometrie, and a quantum flux of 260  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ .

### **Isolation of histones cDNAs**

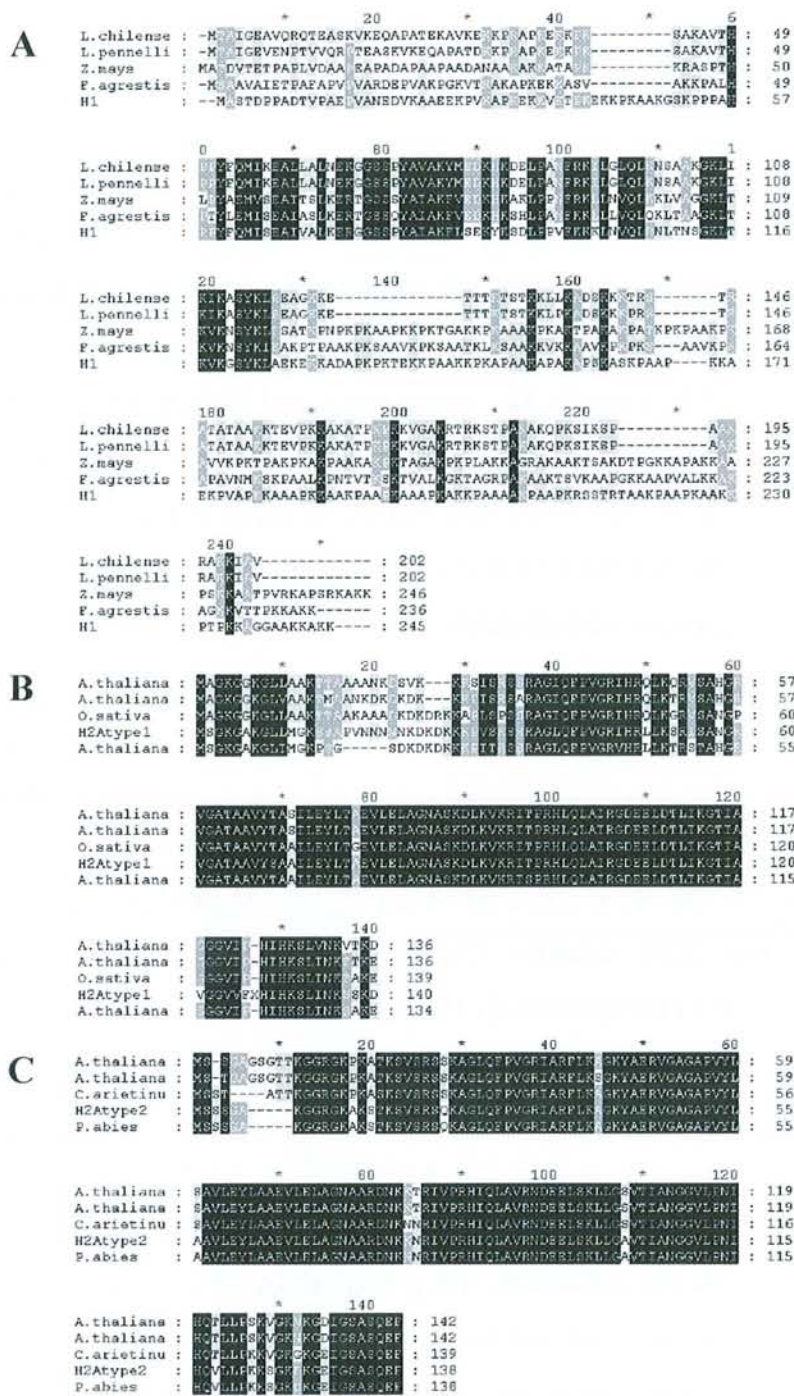
Total RNA was extracted according to Chang et al, (1993), from control and stress roots. First, purified mRNAs (Oligotex, Qiagen) were used as template for mRNA-fingerprinting AFLP based analysis (Bachem et al, 1996). A differentially expressed fragment was found as down-regulated after 21 days of stress (Dubos et Plomion, 2001b). This fragment was then eluted, cloned (TOPO TA-cloning® kit, Invitrogene) and sequenced using an automated sequencer Li-Cor 4000 (Li-Cor Inc). This fragment denoted Pp.rp22 was similar to histone H2B. Second, mRNAs from both stress and non-stress roots and aerial part were used to construct an oriented cDNA library (Uni-Zap® XR vector, Stratagene), from which 2078 ESTs were randomly sequenced (unpublished).

### **Sequence analysis**

Nucleotide sequences were loaded on National Center for Biotechnology Information (NIH, USA) form, for BlastX searching (Altschul et al., 1997). All histone genes were retrieved from the maritime pine EST database. Coding sequence and alignment analysis were performed using ClustalW (Thompson et al., 1994).

### **Northern blot**

Total RNA was extracted from six week-old needles (N), stems (St) and roots (R) from both the control (C) and stress (S) conditions. 10µg total RNA were separated on 1.2% (w/v) agarose/1% (w/v) formaldehyde gel and transferred onto a nylon membrane. Hybridization with [32P]dCTP-labelled probe, from each histone cDNA (RS06B04: H1, AS05B12: H2A type 1, RN07E11: H2A type 2, Pp.rp22: H2B-1, RN02A03: H2B-2, RN05H05: H3 and RN03C09: H4), were carried out at 65°C in 6X SSC, 5X Denhardt and 0.5% SDS buffer. Finally, the membrane was exposed to autoradiographic film for three days at -80°C with screen. The amount of RNA was determined using ethidium bromide stained ribosomal RNA.



**Fig. 1.** Amino acid sequence alignment. Multiple alignment was done using Clustal-W. **A):** Consensus sequence of *Pinus pinaster* histone H1 with its orthologues from *Lycopersicon chilense* (AAF64525), *Lycopersicon pennellii* (P40267), *Zea mays* (P23444) and *Fritillaria agrestis* (AAB86857). **B):** Sequence of *Pinus pinaster* histone H2A type 1 (clone AS05B12) with its orthologues from *Arabidopsis thaliana* (AAD25562), *Arabidopsis thaliana* (T47615), *Oryza sativa* (AAF07182) and *Arabidopsis thaliana* (AAF30323). **C):** Sequence of *Pinus pinaster* histone H2A type 2 (clone RN07E11) with its orthologues from *Arabidopsis thaliana* (AAC64883), *Arabidopsis thaliana* (AAB70416), *Cicer arietinum* (CAA07234) and *Picea abies* (P35063).

---

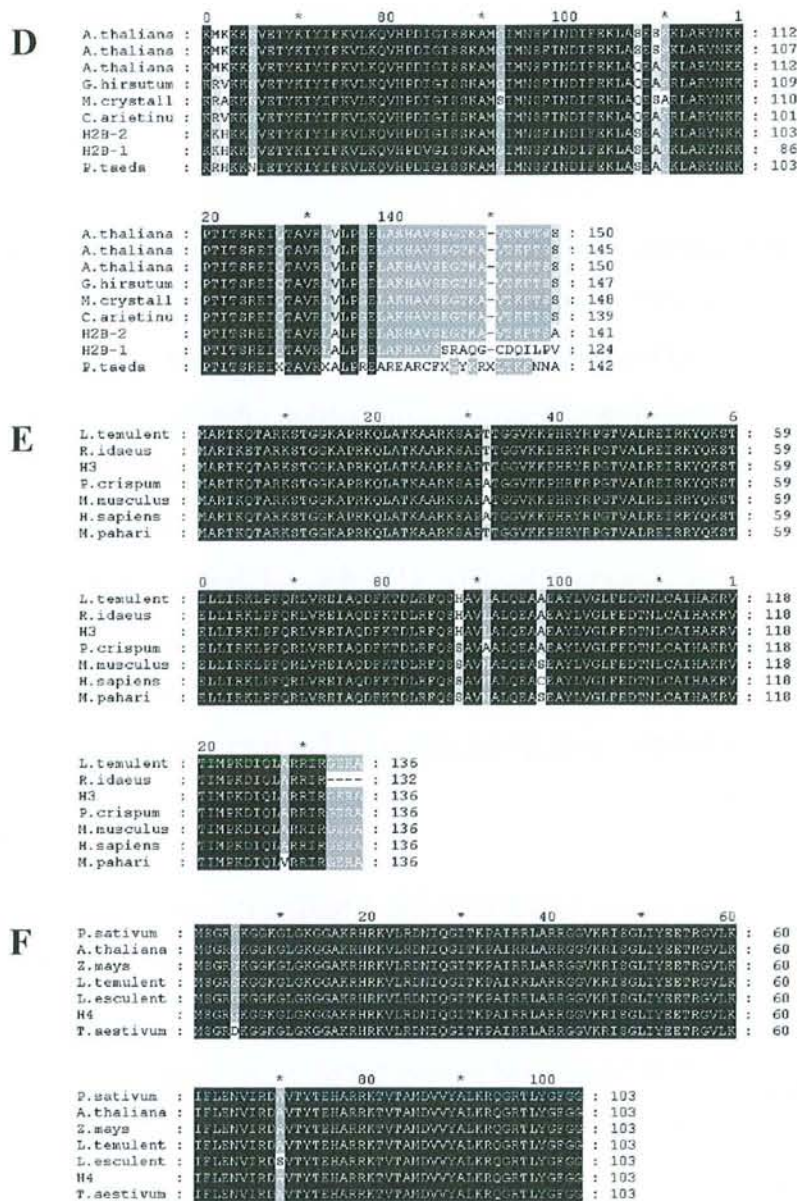
## RESULTS AND DISCUSSION

### Sequence analysis

Two histone H1 cDNA clones (RS06B04: 704bp and RN07B07: 685bp) were compared using blastN. They presented 99% identity on a common section of 465 nucleic acids. The consensus sequence was 935bp long, presented two non translated regions of 124bp upstream the start codon, and 73bp downstream the stop codon. BlastX analysis revealed that the consensus sequence encoded a 245 amino acid protein (MW: 25.5kD, pI: 10.5) corresponding to a wheat (*Triticum aestivum*) histone linker H1 (accession AAD41007) with 67% and 80% of identity and similarity, respectively. The H1 class of histone appears to be the most variable class between species. The protein sequence revealed a highly conserved globular domain in the middle of the gene, and two more variable terminal domains (figure 1.A). However, the N-terminal region was lysine-rich, as it has been reported for this histone group (Spencer et Davie, 1999).

Two histone H2A cDNA clones (AS05B12 and RN07E11), were isolated from the cDNA library. Clone AS05B12, was 719bp long, presented 77% identity and 86% similarity to an *Arabidopsis thaliana* H2A type 1 histone (accession AAF30323). Sequence analysis revealed that this clone encoded a 140 amino acid protein (MW: 14.8kD, pI:10.5). Protein comparison showed that the encoded protein was highly conserved between angiosperm and gymnosperm species. As described for histone H2A type 2 (see next paragraph), this clone presented a variable zone near the C-terminal (figure 1.B).

Clone RN07E11 was 702bp long and encoded a 138 amino acid protein (MW: 14.5kD, pI:10.4). corresponding to a *Picea abies* (accession P35063) histone H2A (Sundas et al, 1993), with 100% identity. This clone is a member of the histone H2A type 2. Multiple alignment revealed that gymnosperm histone H2A type 2 were shorter compared to that of angiosperms (figure 1.C). The missing part corresponding to a deletion near the C-terminal. However, others changes in amino acid sequence at specific positions were also observed between gymnosperm and angiosperm species: a serine was replaced by an alanine in position 15, two alanine by two serine in positions 56 and 103, a valine by a threonine in position 118, and a serine by a valine in position 126. These variations suggests a differential phosphorylation of histone H2A type 2 in gymnosperm species (serine and threonine residues



**Fig. 1.** Amino acid sequence alignment. Multiple alignment was done using Clustal-W. **D**): Sequences of *Pinus pinaster* histone H2B-1 (clone Pp.ap22) and H2B-2 (clone RN02A03) with their orthologues from *Arabidopsis thaliana* (T47538), *Arabidopsis thaliana* (CAB88327), *Arabidopsis thaliana* (BAB08359), *Gossypium hirsutum* (O22582), *Mesembrythemum crystallinum* (BE037288), *Cicer arietinum* (CAB88668) and *Pinus taeda* (ST04G05). **E**): Sequence of *Pinus pinaster* histone H3 (clone RN05H05) with its orthologues from *Lolium temulentum* (P11105), *Rubus idaeus* (AAG22548), *Petroselinum crispum* (P05203), *Mus musculus* (NP\_038576), *Homo sapiens* (NP\_003520) and *Mus pahari* (I49395). **F**): Sequence of *Pinus pinaster* histone H4 (clone RN03C09) with its orthologues from *Pisum sativum* S60475, *Arabidopsis thaliana* S06904, *Zea mays* HSZM4, *Lolium temulentum* P02308, *Lycopersicon esculentum* P35057 and *Triticum aestivum* HSWT41. Dashes indicate gaps introduced to maximise the alignment. Identical and similar residues are shaded.

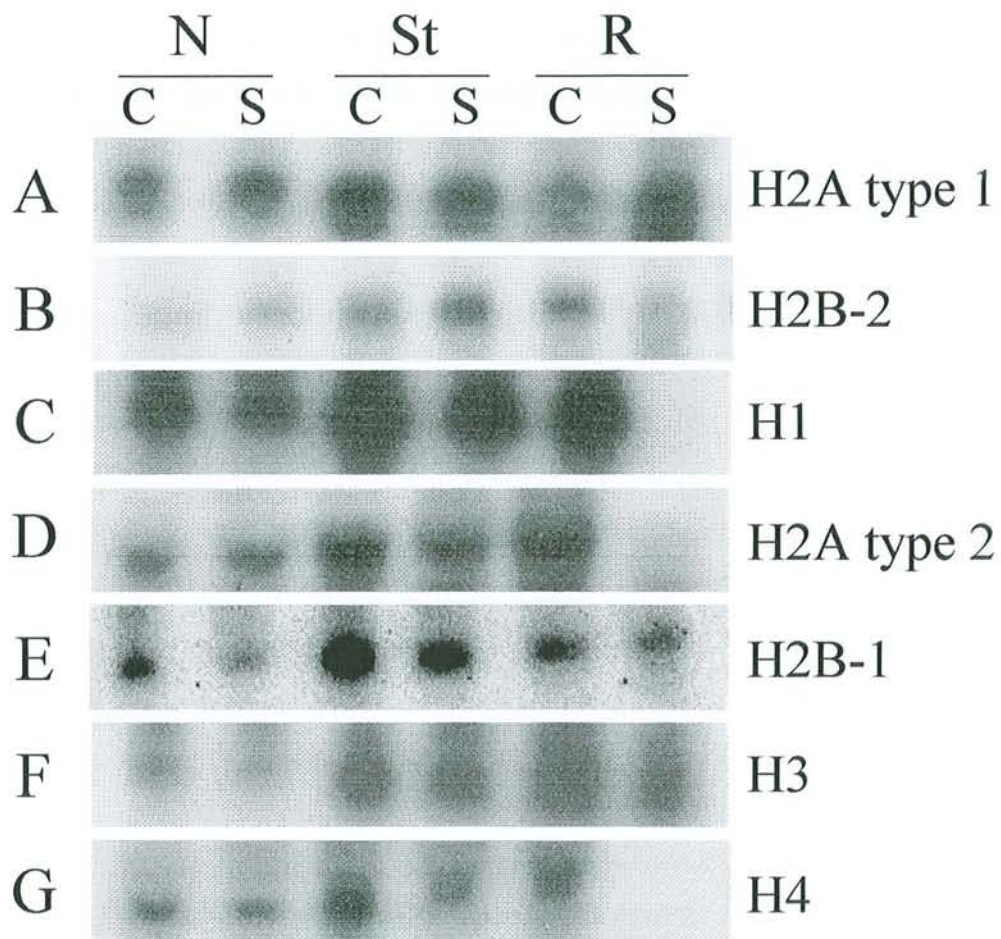
represent amino acid targets for phosphorylation), which could be involved in the cell cycle regulation as described for histone H1 and H3 (Spencer and Davie, 1999).

Two histones H2B clones were isolated corresponding to Pp.rp22 (previously found as being over-expressed in drought stressed seedlings by cDNA-AFLP) and RN02A03 (isolated from the cDNA library). BlastX analysis revealed that this two different clones matched with the same *Arabidopsis thaliana* (T47538) histone H2B sequence, with 96% and 98% of identity and similarity, respectively.

Clone Pp.rp22 (denoted H2B-1) was 374bp long and encoded a 124 amino acid (MW: 13.7kD pI: 10.1). The carboxy terminal region contained 66 highly conserved amino acids, corresponding to the  $\alpha$ -helix and  $\beta$ -loop domains. These structures were shown in the nucleosome core particle as part of an histone-histone complex (e.g. H2A-H2B) and histone-DNA interaction (Luger et al., 1997). The N-terminal region (Figure 1D) showed a shorter sequence. It contained the nucleosome core remodeling AEKKPA motif and a lysine-rich domain. The amino acids contiguous to this sequence were more variable between plant species, but all contained two conserved domains: EKKP and PKAxKK. Pp.rp22 exhibited a deletion between the nucleosome core remodeling site and the PKAxKK motif. Interestingly, Recht and Osley (1999), showed that a deletion in yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) histone H2B was not lethal, the same type of deletion was observed in our clone.

Clone RN02A03 (denoted H2B-2) was isolated from the cDNA library. It was 633bp long and encoded a 141 amino acid putative protein, (MW: 15.4kD; pI: of 10.1). This clone was shorter than other plant histone H2B. The function for these variable amino acid N-terminal domain is still unclear but does not seem to have an impact on the protein integrity.

A 684bp clone (RN05H05) was 100% similar to a *Lolium temulentum* (accession P35063) minor variant histone H3.2 and encoded a putative protein of 136 amino acids (MW: 15.4kD; pI: 11.3). A higher level of acetylation was found in alfalfa as variant of this protein (Waterborg, 1990). As described by Wu et al (1990), a consensus sequence for plant H3 histones which differs from that of mammals by four amino acid changes was found, based on compilation analysis (figure 1E). It has been suggested that the conservation of H3 tail can be due to its involvement in the stabilization of the three-dimensional structure of chromatin (Zlatanova et al., 1998).



**Figure 2:** Northern blot analysis of seven histone transcript in needles (N), stem (St) and roots (R), in both the control (C) and stress (S) conditions. rRNA was used as a control.

Clone (RN03C09) was 615bp long. This gene encoded a putative protein of 103 amino acids, and presented 100% of similarity with a *Triticum aestivum* (HSWT41) histone H4 on blastX analysis (figure 1F). (MW: 11.4kD; pI: 11.6).

### Expression analysis

The histone studied in this experiment presented a constitutive expression in the three tested tissues (needles, stems and roots), but their level of expression varied between the well-watered and drought-stressed conditions. Linker histone H1 was highly expressed in the three tissues, presenting a slight decrease in drought-stressed needles and stems, and a strong down-regulation in stressed roots (Figure 2A). This behaviour is likely to be the consequence of plant growth inhibition. The expression level of histone H2A (type 1 and type 2) was greater in stems and roots, compared to that in needles, but no (in needles) or slight (in stem) differences were found between the control and treated plants. Conversely, strong differential expressions were observed in the roots, where the two H2A histones presented opposite regulation patterns, being in the drought condition, over-expressed for type1 (Figure 2B) or strongly repressed for type2 (Figure 2C). This is the first report to our knowledge showing such opposite trends for H2A variants. It could be hypothesized that the type 1 histone is involved in gene regulation in a tissue specific dependant manner (ie. in root), whereas the type 2 histone is regulated in response to growth inhibition. The expression level of histone H2B (type 1 and type 2) was greater in stems compared to that in needles and roots. Both histones presented different expression patterns. While H2B-1 decreased in the three tissues (Figure 2D), H2B-2 increased in needles and stems and decreased in roots (Figure 2E). Again this duality indicates the complex response of histone genes in drought stressed plants. The expression level of histone H3 was greater in stems and roots compared to that in needles, being slightly repressed in the three stressed tissues (Figure 2F). The same result was observed for histone H4, with a much stronger decrease in drought-stressed roots (Figure 2G). For these two histones these behaviour can be connected to growth inhibition.



## CONCLUSION

We characterized, for the first time in a conifer species, several histone genes and followed their expression patterns in drought-stressed seedlings. We showed that: mRNA level generally decreased in roots submitted to a prolonged drought (here 21 days of stress). This response is likely to correspond to a general inhibition of cell division in roots as reported in other studies (Bilgin et al., 1999; Van Den Heuvel et al., 1999; Renaudin et al, 1994). We also showed that histone variants presented opposite expression patterns (H2A-1 vs. H2A-2 in roots; H2B-1 vs. H2B-2 in stems), suggesting a role of over-expressed variants in the regulation of the transcriptional activity.

## ACKNOWLEDGMENTS

CD is supported by a Doctoral Scholarship from the French Ministry of Research and Technology. We acknowledge fundings from the European Union (INCO-IC18-CT97-0200), Région Aquitaine (n°980307005) and INRA (ECOGENE n°92).

## REFERENCES

- Altschul SF, Stephen F, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W., Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*. 25: 3389-3402
- Ascenzi R and Gantt JS. 1997. A drought-stress-inducible histone gene in *Arabidopsis thaliana* is a member of a distinct class of plant linker histone variants. *Plant Molecular Biology*. 34 (4): 629-641.
- Ascenzi R and Gantt JS. 1999a. Subnuclear distribution of the entire complement of linker histone variants in *Arabidopsis thaliana*. *Chromosoma*. 108 (6): 345-355.
- Ascenzi R and Gantt JS. 1999b. Molecular genetic analysis of a drought-inducible linker histone variant in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*. 41 (2): 159-169.
- Bachem CWB, Van der Hoeven RS, de Bruijn SM, Vreugdenhil D, Zabeau M, Visser RGF. 1996. Visualisation of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: Analysis of gene expression during potato tuber development. *Plant J* 9: 745-753.
- Bilgin M, Dedeoglu D, Omirulleh S, Peres A, Engler G, Inzé D, Dudits D, Fehér A. 1999. Meristem, cell division and S phase-dependent activity of wheat histone H4 promoter in transgenic maize plants. *Plant Science*. 143: 35-44.
- Bray EA, Shih TY, Moses MS, Cohen A, Imai R, Plant AL. 1999. Water-deficit induction of a tomato H1 requires abscisic acid. *Plant Growth Regulation*. 29 (1/2): 35-46.
- Chang, S., Puryear, J., Cairney, J. 1993. A simple and efficient method for Isolating RNA from pine trees. *Plant Molecular Biology*. 11: 113-116.
- Chang S, Puryear J, Cairney J. 1995. Gene expression under water deficit in loblolly pine (*Pinus tarda* L): Isolation and characterization of cDNA clones. *Physiologia Plantarum* 95: 139-148.
- Collart D, Romain PL, Huebner K, Pockwinse S, Pilapil S, Cannizzaro LA, Lian JB, Croce CM, Stein JL, Stein GS. 1992. A human histone H2B.1 variant gene, located on chromosome 1, utilizes alternative 3' end processing. *Journal of Cellular Biochemistry*. 50: 374-385.
- Costa P, Bahrman N, Frigerio J-M, Kremer A, Plomion C. 1998. Water-deficit-responsive proteins in maritime pine. *Plant Molecular Biology*. 38: 587-596.
- Cushman JC, Bohnert HJ. 2000. Genomic approaches to plant stress tolerance. *Current Opinion in Plant Biology*. 3: 117-124.
- Deleu C, Coustaut M, Niogret MF, Larher F. 1999. Three new osmotic stress-regulated cDNAs identified by differential display polymerase chain reaction in rapessed leaf discs. *Plant, Cell and Environment*. 22 (8): 979-988.
- Doyle JJ and Doyle JL. 1988. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus (BRL)*. 12: 13-15.
- Dubos C, Plomion C. 2001a. Drought differentially affects expression of a PR-10 protein, in needles of maritime pine (*Pinus pinaster* Ait) seedlings. *Journal of Experimental Botany*. 52: 1-2.
- Dubos C, Plomion C. 2001b. Identification of water-deficit responsive genes in maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.) roots using non radioactive cDNA-AFLP. *Plant Mol Biol*. Submitted.
- Ingram J, Bartels D. 1996. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology*. 47: 377-403.
- Koshland D, Strunnikov A. 1996. Mitotic chromosome condensation. *Annual Review Cell Dev Biol*. 12: 305-333.

Luger K, Mader AW, Richmond Rk, SargentDF, Richmond TJ. 1997. Crystal structure of the nucleosome core particule at 2.8Å resolution. *Nature*. 389: 251-260.

Mayne MB, Coleman JR, Blumwald E. 1996. Differential expression during drought conditioning of a root-specific S-adenosylmethionine synthetase from jack pine (*Pinus banksiana* Lamb.) seedlings. *Plant, Cell and Environment*. 19: 958-966.

Nguyen A and Lamant A. 1989. Variation in growth and osmotic regulation of roots of water-stressed maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.) provenances. *Tree physiology*. 5, 123-133.

Padmanabhan V, Dias DMAL, Newton RJ. 1997. Expression analysis of a gene family in loblolly pine (*Pinus taeda* L) induced by water deficit stress. *Plant Molecular Biology* 35: 801-807.

Ramakrishnan V. 1997. Histone H1 and Chromatin Higher-Order Structure. *Critical Review in Eukaryotic Gene Expression*. 7: 215-230.

Recht J and Osley MA. 1999. Mutations in both the structured domain and N-terminus of histone H2B bypass the requirement for Swi-Snf in yeast. *The EMBO Journal*. 18 (1): 229-240.

Renaudin JP, Colosanti J, Rime H, Yuan Z, Sundaresan V. 1994. Cloning of four cyclins from maize indicates that higher plants have structurally distinct groups of mitotic cyclins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 91: 7375-7379.

Schultz TF, Spiker S, Quatrano RS. 1996. Histone H1 enhances the DNA binding activity of the transcription factor EmBP-1. *Journal of Biological Chemistry*. 271 (42): 25742-25745.

Spencer VA and Davie JR. 1999. Role of covalent modifications of histones in regulating gene expression. *Gene*. 240:1-12.

Sullivan SA, Aravind L, Makalowska I, Baxevanis AD, Landsman D; 2000. The histone database: a comprehensive www resource for histones and histone fold-containing proteins. *Nucleic Acids Research*. 28 (1): 320-322.

Sundas A., Tandre K., Kvarnheden A, Engstrom P. 1993. cDNA sequence and expression of an intron-containing histone H2A gene from Norway spruce, *Picea abies*. *Plant Molecular Biology*. 21 (4): 595-605.

Thoirion S and Briat JF. 1999. Differential expression of maize sugar responsive genes in response to iron deficiency. *Plant Physiology and Biochemistry*. 37 (10): 759-766.

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*. 22: 4673-4680.

Van Den Heuvel KJ, Van Esch RJ, Barendse GW, Wullems GJ. 1999. Isolation and molecular characterization of gibberellin-regulated H2 and H2B histone cDNAs in the leaf of the gibberellin-deficient tomato. *Plant Molecular Biology*. 39 (5): 883-890.

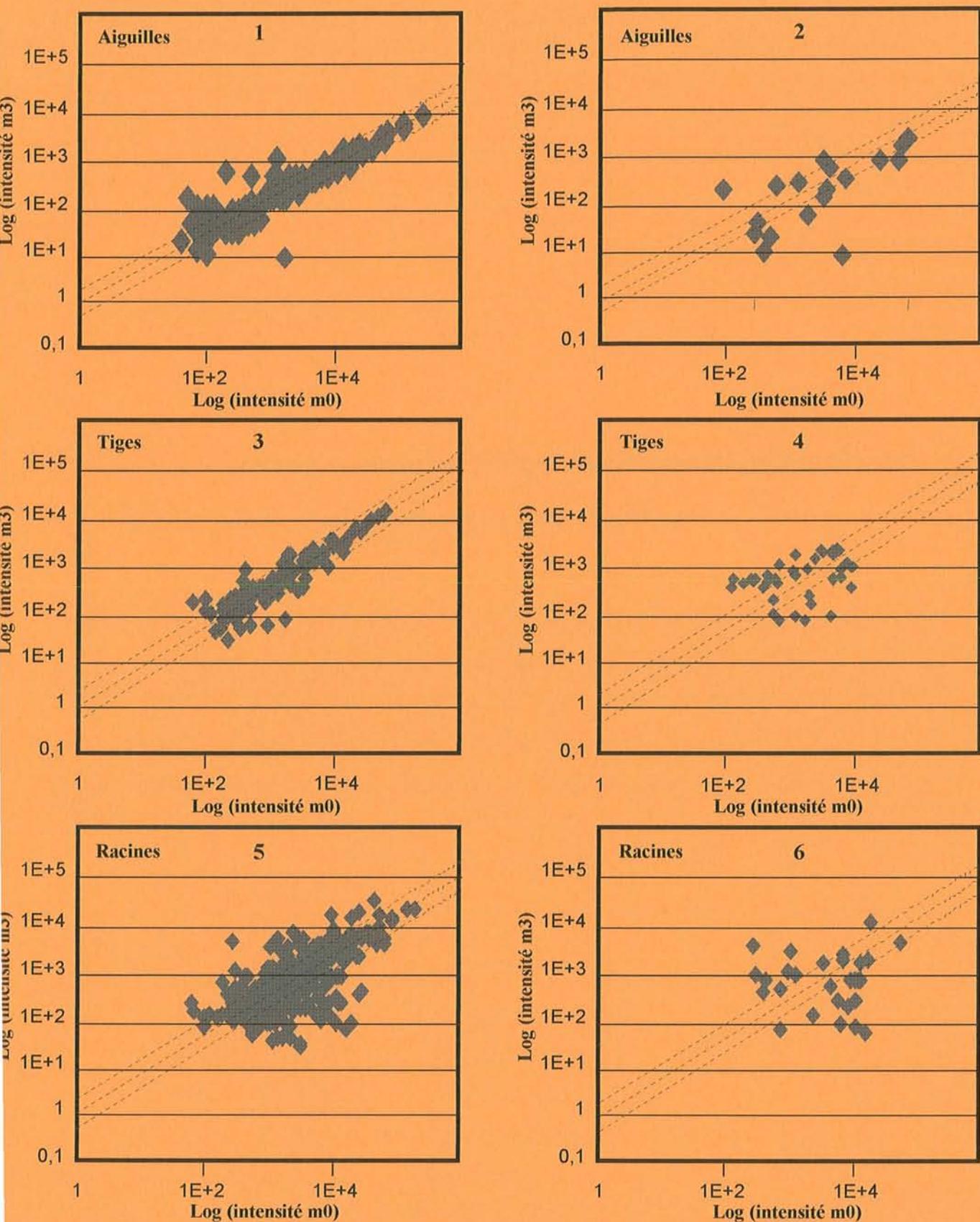
Waterborg JH. 1990. Sequence analysis and methylation in two histone H3 variants of alfalfa. *Journal of biological Chemistry*. 265 (28): 17157-17161.

Wu SC, Gyorgyey J, Dudits D. 1989. polyadenylated H3 histone transcripts and H3 variants in alfalfa. *Nucleic Acids Research*. 17 (8): 3057-3063.

Zlatanova J, Leuba SH, Van Holde K. 1998. Chromatin fiber structure: morphology, molecular determinants, structural transmission. *Biophysical Journal*. 74: 2554-2566.

## Identification de protéines impliquées dans la réponse au stress hydrique chez le pin maritime

Nous avons analysé la réponse moléculaire de jeunes plantules (6 semaines) de pin maritime vis-à-vis d'un déficit d'alimentation en eau (21 jours de traitement, m0 : -0,08MPa vs m3 : -0,45MPa), au niveau de trois tissus différents : les aiguilles, les tiges et les racines. Nous montrerons qu'au cours de l'application du stress, le profil protéique du pin maritime évolue considérablement avec l'augmentation et la diminution d'intensité des spots, voire l'apparition ou la disparition.



**Figure 33 :** Variation de l'intensité des spots entre les conditions témoin (m0) et stressé (m3), au niveau des tissus analysés (aiguilles 1,2 ; tiges 3, 4 ; racines 5,6). Les graphes 1, 3 et 5 représentent l'ensemble des spots analysés. Les graphes 2, 4 et 6 les spots significativement différents entre les deux conditions après ANOVA (5%). Les droites en pointillé  $x=y$ ,  $x=2y$  et  $x=0,5y$  sont indiquées pour visualiser les spots dont la quantité est deux fois plus ou deux fois moins importante en condition stressée.

Afin d'observer les variations de quantité d'un maximum de protéines, nous avons choisi d'analyser la majeure partie des spots présents sur les gels. Les gels des conditions témoins non stressés ont été utilisés comme image de références dans l'analyse d'image. Nous avons aussi pu analyser à la fois les augmentations et les diminutions d'intensité, ainsi que la disparition de certains spots dans la condition stressée. Nous avons également analysé de manière séparée les spots qui apparaissent dans la condition stressée. Notons ici que les notions « d'apparition/disparition » constituent un abus de langage, les protéines concernées pouvant très bien exister mais à un niveau tellement faible qu'il n'a pas été possible de les détecter avec la coloration au nitrate d'argent.

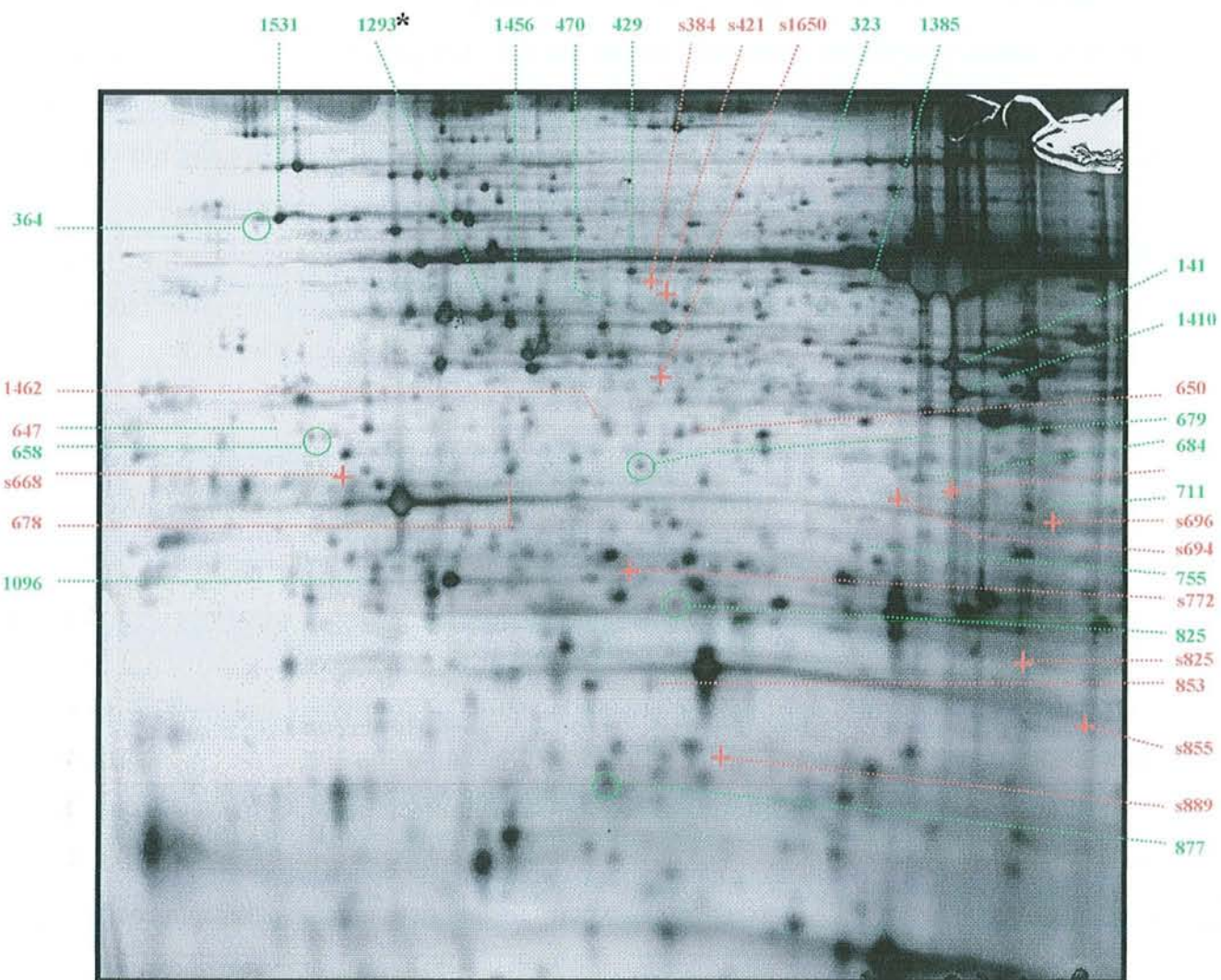
Disposant de 2 répétitions de chaque gel, nous avons réalisé une analyse de variance (ANOVA) afin d'identifier les spots dont l'accumulation était significativement affectée par le stress. L'analyse a porté sur 424 spots pour les aiguilles, 361 spots pour les tiges et 386 spots pour les racines

La question du seuil à partir duquel un transcrite ou une protéine peut être considéré comme différentiellement exprimé au cours du développement ou entre conditions de croissances différentes, fait souvent l'objet de controverse. Le doublement de la quantité est souvent pris comme seuil de signification (Voiblet et al., 2001).

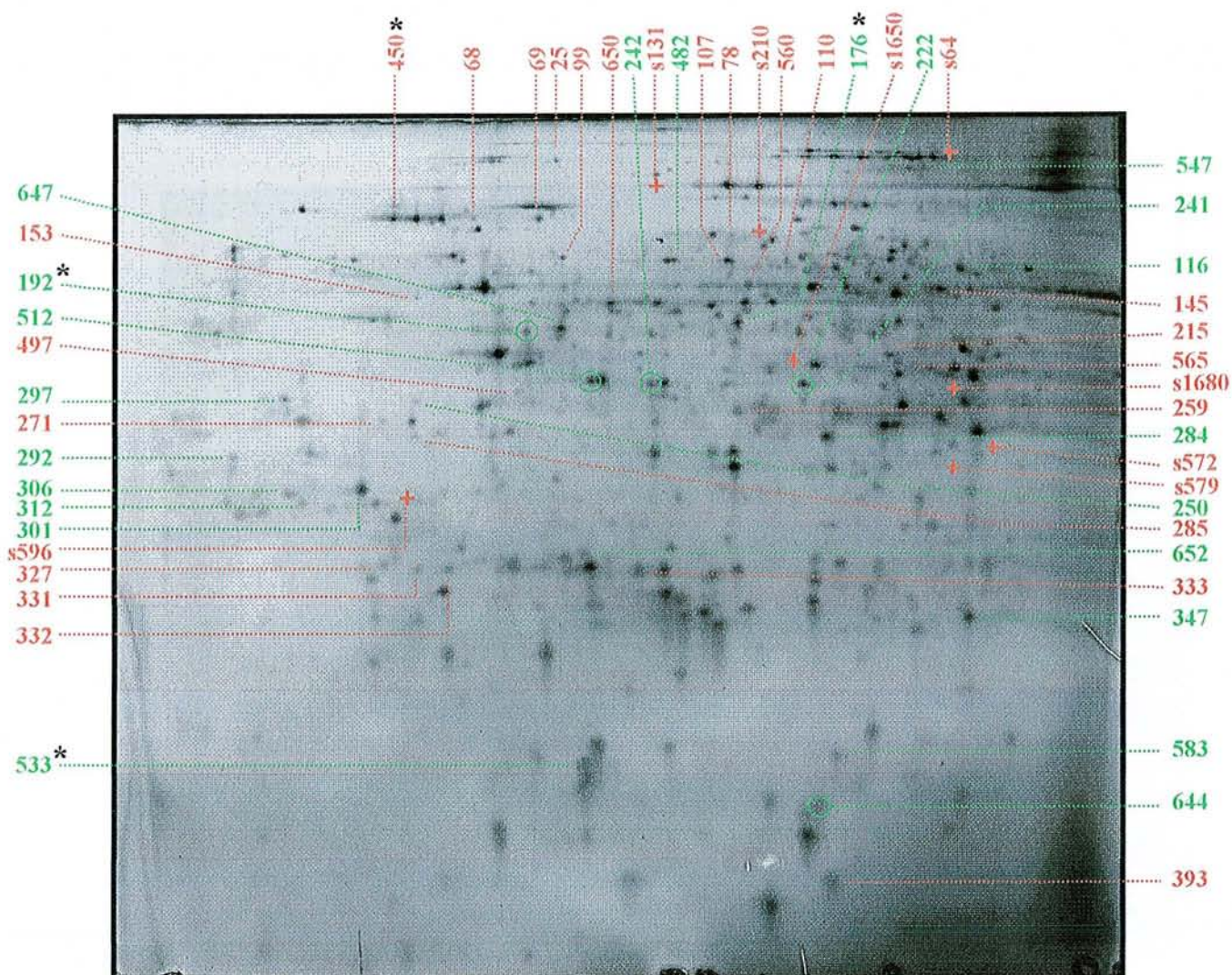
Dans cette expérience, nous avons voulu savoir si un tel seuil déterminé expérimentalement avait aussi un sens statistique.

En comparant la moyenne des intensités des spots entre les deux conditions (pour chaque tissu) nous avons observé que la majeure partie des spots pour lesquels le test de l'ANOVA était significatif présentait une variation supérieure à 200% et inférieure à 50% (figure 33). La réciproque n'est cependant pas vraie. C'est pourquoi de nombreux spots ont été éliminés bien qu'ils présentaient une augmentation ou bien une diminution du double au cours du stress. Pour expliquer ce résultat, il faut considérer que l'intensité dans chacune des conditions était plus importante comparée à l'écart moyen entre les deux conditions pour que le test soit significatif.

L'ANOVA est donc plus stringente. Elle permet de diminuer l'erreur de type 1 (déclarer un spot significatif alors qu'il ne l'est pas) mais augmente celle de type 2 (manquer un spot réellement différentiellement exprimé).

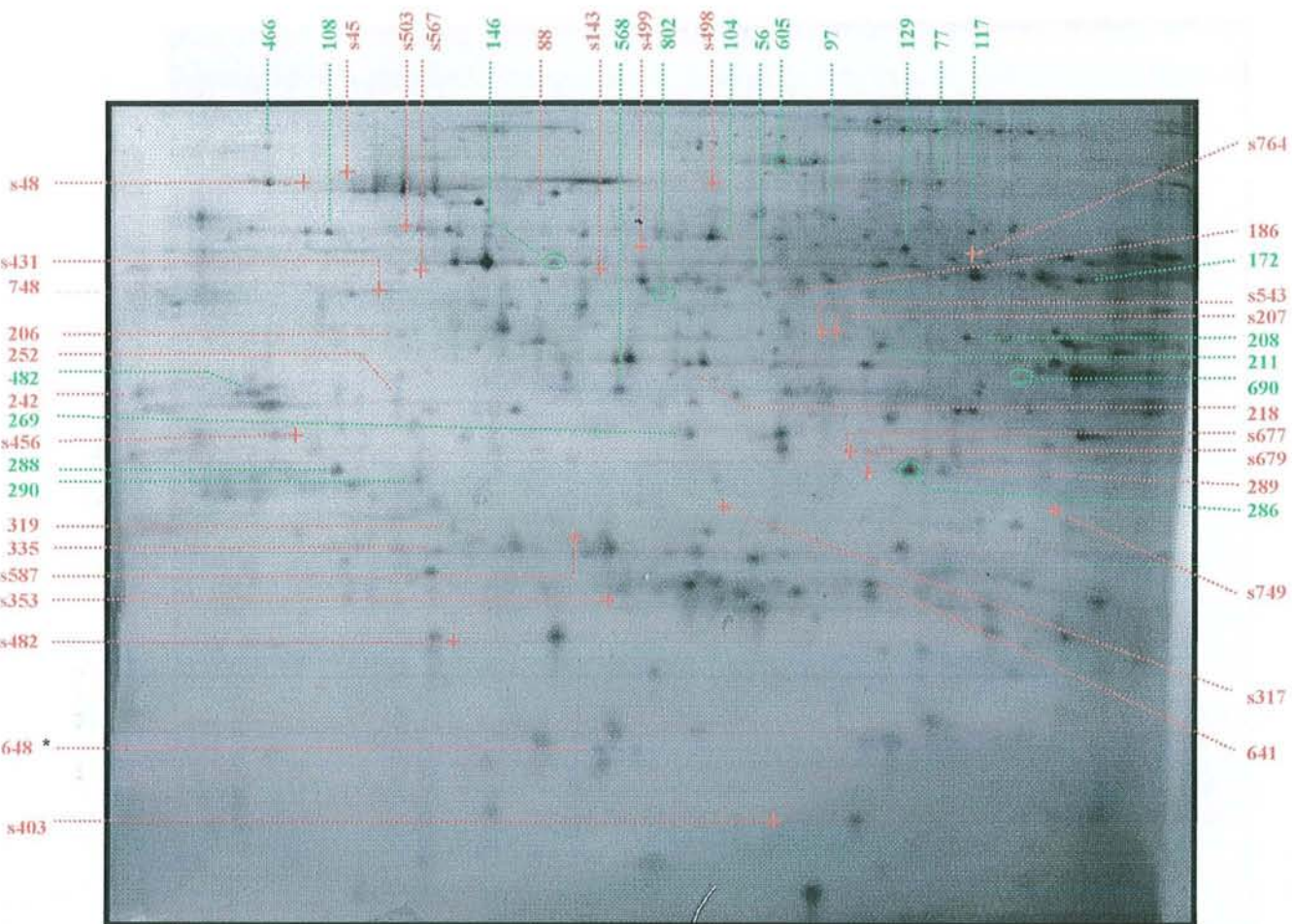


**Figure 34** : Gel d'électrophorèse bidimensionnelle de référence pour les protéines extraites d'aiguilles de pin maritime âgés de six semaines en condition de bonne alimentation en eau. La position des spots analysés après l'ANOVA est indiquée par des tirets. Les tirets rouges correspondent aux spots dont l'intensité augmente au cours du stress. Les tirets verts correspondent aux spots dont l'intensité diminue au cours du stress. Les croix rouges représentent la position des spots qui apparaissent dans la condition stressée. Les cercles verts entourent les spots qui disparaissent au cours du stress. \* : protéine de fonction connue.



**Figure 35** : Gel d'électrophorèse bidimensionnelle de référence pour les protéines extraites de tiges de pin maritime âgés de six semaines en condition de bonne alimentation en eau. La position des spots analysés après l'ANOVA est indiquée par des tirets. Les tirets rouges correspondent aux spots dont l'intensité augmente au cours du stress. Les tirets verts correspondent aux spots dont l'intensité diminue au cours du stress. Les croix rouges représentent la position des spots qui apparaissent dans la condition stressée. Les cercles verts entourent les spots qui disparaissent au cours du stress. \* : protéine de fonction connue.





**Figure 36** : Gel d'électrophorèse bidimensionnelle de référence pour les protéines extraites de racines de pin maritime âgés de six semaines en condition de bonne alimentation en eau. La position des spots analysés après l'ANOVA est indiquée par des tirets. Les tirets rouges correspondent aux spots dont l'intensité augmente au cours du stress. Les tirets verts correspondent aux spots dont l'intensité diminue au cours du stress. Les croix rouges représentent la position des spots qui apparaissent dans la condition stressée. Les cercles verts entourent les spots qui disparaissent au cours du stress. \* : protéine de fonction connue.

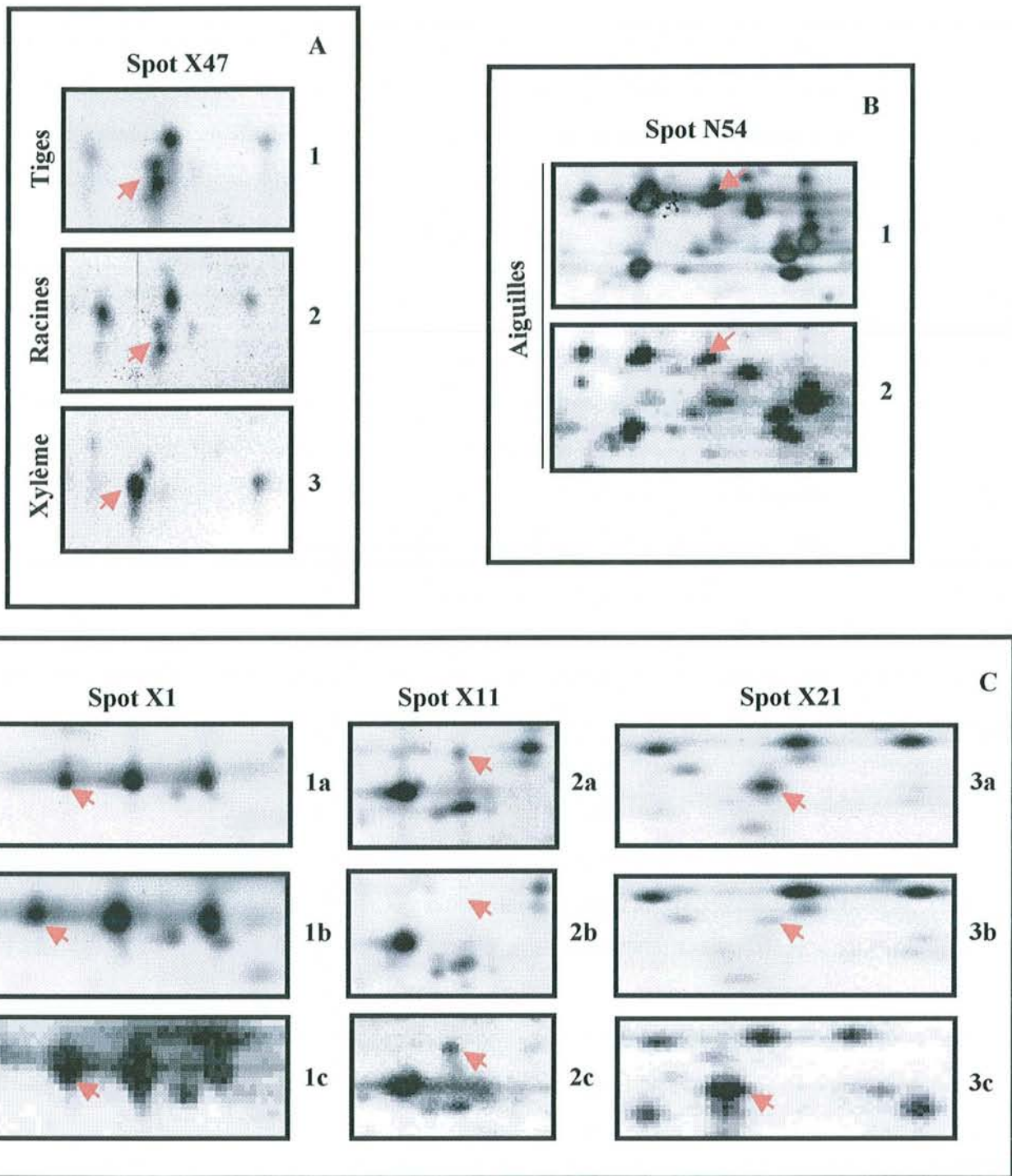
Au niveau des aiguilles, 34 spots (8%) présentent une variation significative entre les deux conditions. Nous avons observé une augmentation de l'intensité pour 16 spots et une diminution de l'intensité pour 18 spots. Parmi les spots dont l'intensité augmente, 11 sont absents dans la condition témoin. Parmi les spots dont l'intensité diminue, cinq disparaissent (figure 34).

Pour les tiges, nous avons retenu 51 spots (14%), parmi lesquels 32 présentent une augmentation d'intensité et 19 une diminution. Nous avons observé au cours du stress l'apparition de huit spots, et la disparition de cinq (figure 35).

Enfin, au niveau des racines, 53 spots (14%) ont été retenus. 32 spots présentaient une augmentation d'intensité, parmi lesquels 20 sont présents uniquement dans la condition stressée. Au niveau des 21 spots dont l'intensité diminue, quatre disparaissent au cours du stress (figure 36).

Au niveau des aiguilles, ces résultats reflètent certainement une baisse générale du métabolisme qui semble être liée à une diminution de l'activité photosynthétique. En effet, 57% des spots analysés présentent une diminution de leur intensité en condition stressée. Au niveau des tiges et des racines, il semblerait que la réponse au stress soit plus marquée. En effet, la proportion de protéines qui présentent une diminution de l'intensité en condition stressée n'est que de 38% et 40% pour les tiges et les racines, respectivement. On constate donc que le pourcentage de protéines dont l'intensité diminue au cours du stress est plus important dans les aiguilles que dans les tiges et les racines.

Dans une expérience précédente, portant sur l'identification de protéines de stress à partir d'aiguilles de pins maritimes âgés de deux ans, Costa (1999) a trouvé 120 spots répondant de façon significative à l'application du stress dont 63% diminuent et 27% augmentent. Malgré le fait que nous avons mis en évidence un nombre beaucoup plus faible de variations de quantité de protéines liées au stress que Costa (1999) (probablement dû au peu d'individus que nous avons analysés et donc une puissance plus faible du test statistique), nous obtenons dans les deux expériences des ratios de variation d'intensité entre les deux conditions qui sont similaires : 2/3 de diminution et 1/3 d'augmentation. En comparant les gels entre ces deux expériences, nous avons observé que la majeure partie des spots étaient communs, bien que nous n'ayons pas étudié les aiguilles aux mêmes stades de développement. Cependant, suite à l'échantillonnage, seuls trois spots analysés étaient communs à ces deux expériences.



**Figure 37** : Analyse de gel d'électrophorèse bidimensionnelle. Identification de l'identité de protéine dans les aiguilles, tiges et racines de plantules âgées de six semaines, comparés à des profils de xylème d'arbre adulte (X1, X11, X21 et X47) ou d'aiguilles de plants âgés de deux ans (N54), par positionnement relatif. **A**) : Spot X47, protéine de choc thermique de faible poids moléculaire type I. 1 et 2 : tiges et racines de plants âgés de six semaines, 3 : xylème d'arbre adulte . **B**) : Spot N54 : rubisco activase, 1 : aiguilles de plants âgés de six semaines, 2 : aiguilles de plants âgés de deux ans. **C**) : 1a, 2a et 3a : tiges de plants âgés de six semaines témoins, 1b, 2b et 3b : tiges de plants âgés de six semaines stressés, 1c, 2c et 3c : xylème d'arbre adulte. Spot X1 : (1a et 1b) protéine chaperonne (Hsp70), Spot X11 (2a et 2b) et X21 (3a et 3b) : SAM synthase.

Les spots n°1531 et n°1293 analysés dans notre expérience correspondent, respectivement, aux spots n°N4 et n°N54 dans les aiguilles de plants âgés de deux ans. L'intensité de ces deux spots diminue au cours du stress, dans les deux expériences, ce qui semble indiquer que ces protéines sont sous-exprimées lors d'un stress hydrique, indépendamment de l'âge des plants et de la manière dont le stress hydrique a été appliqué (hydroponie dans notre cas et arrêt d'arrosage de plants en pots chez Costa, 1999). *A contrario*, le troisième spot n°1462 présente une augmentation d'intensité dans notre expérience, alors que dans des plantules âgées de deux ans (n°N72) les auteurs ont observé une diminution. Cette différence peut être due à une différence de maturité des plants, voire plus simplement des aiguilles, ou aux méthodes utilisées pour l'application du stress hydrique (arrêt d'arrosage vs hydroponie).

Bien que le tissu photosynthétique soit classiquement le plus étudié, il semblerait que les phénomènes de mise en place de la tolérance au stress hydrique soient plus marqués dans les organes d'assimilation et de transports. En effet nous avons observé une augmentation de la quantité pour plus de 60% des protéines analysées à la fois dans les tiges et dans les racines, dont la majeure partie sont des apparitions. C'est pourquoi des études plus détaillées de ces deux tissus pourraient nous apporter de nouvelles informations sur la tolérance au stress hydrique.

Pour les spots dont l'intensité ne varie pas significativement entre les deux conditions, il semblerait que leur expression ou leur « turn-over » soit indépendant du stress appliqué. En effet certaines protéines peuvent avoir un seuil d'expression optimal nécessaire au fonctionnement de la cellule. Cependant, on peut aussi avancer l'hypothèse que cette stabilité reflète la faible puissance du test utilisé, à savoir que nous n'avons pas réalisé assez de répétitions pour pouvoir détecter des différences faibles.

Grâce au séquençage de protéines réalisé au cours des expériences précédentes (Costa, 1999 – Plomion et al., 2000), sur aiguilles et sur xylème, nous avons pu attribuer une fonction à cinq spots : un spot dans les aiguilles, un spot commun aux tiges et aux racines, et enfin quatre spots dans les tiges.

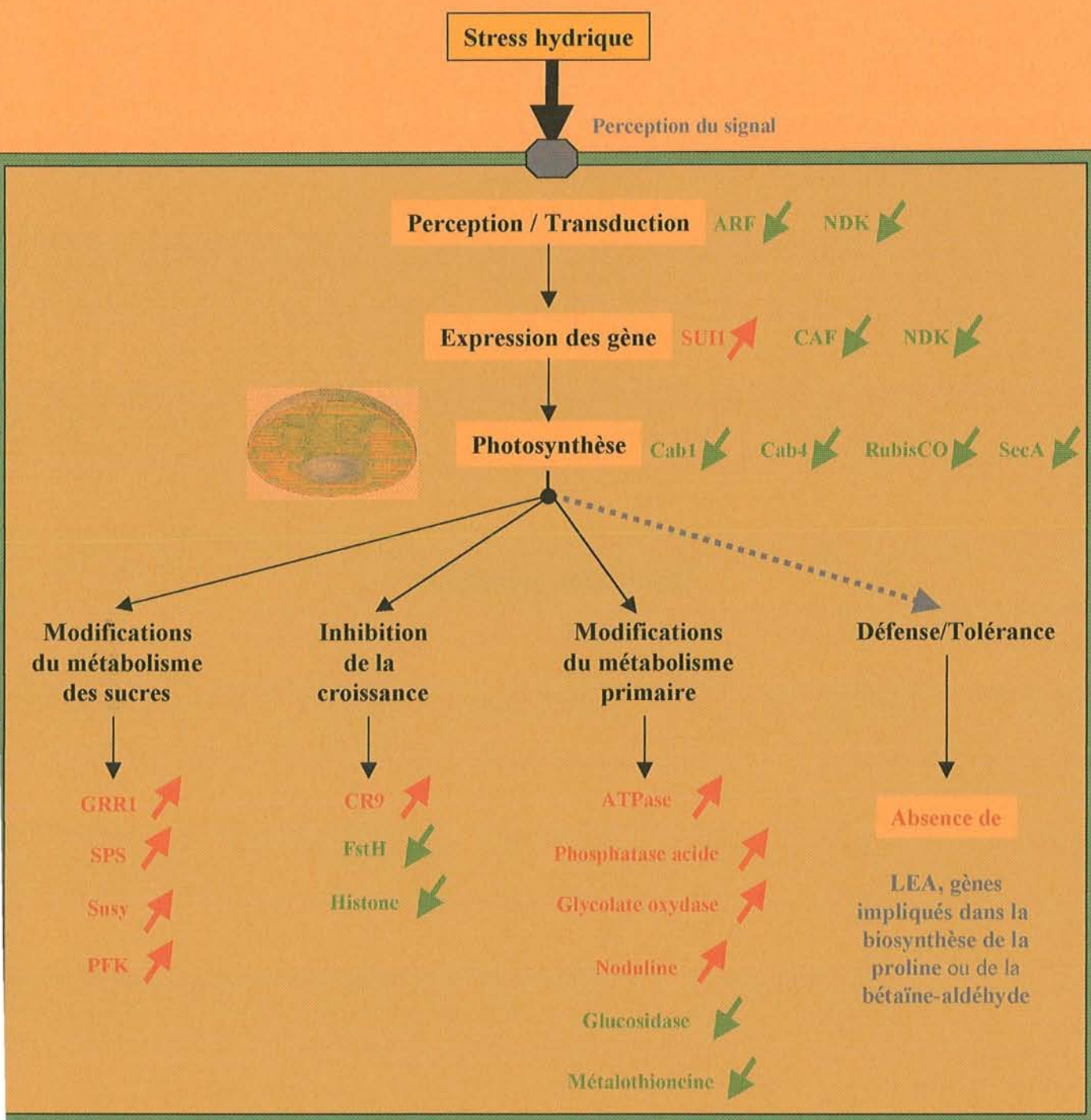
Le spot n°1293 de notre expérience correspond au spot n°N54, (rubisco activase, figure 37.A.). De la même manière que l'a observé Costa (1999) ce spot présente une diminution d'intensité au cours du stress hydrique. Cette protéine joue un rôle clef au niveau de l'assimilation du carbone atmosphérique *via* l'activation de la ribulose 1,5-biphosphate

carboxylase/oxygenase (rubisCO). Ainsi l'observation de la diminution de la quantité de cette protéine est directement liée à une diminution de l'activité photosynthétique.

Le spot commun aux tiges (n°533) et aux racines (n°648) correspond au spot n°X47 isolé dans le xylème (Plomion et al., 2000 ; figure 37.B.). Cette protéine correspond à une Hsp, protéine de choc thermique de faible poids moléculaire (type I). Les protéines de choc thermique sont connues comme étant sur-exprimées en réponse à différents types de stress. Cependant, cette protéine présente un comportement différent entre les deux tissus : à savoir une augmentation de l'intensité dans les racines et une diminution dans les tiges de plants stressés. Bien que l'augmentation de cette protéine dans les racines soit en accord avec la littérature (Waters et al., 1996), l'interprétation de sa diminution dans les tiges reste incertaine. Enfin les trois autres spots , n°176, 192 et 450 (figure 37.C.), correspondent respectivement à deux SAM synthétase (X21 et X11, S-adenosyl-méthionine synthetase) et une protéine chaperonne (X1, protéine de choc thermique, Hsp 70). Les protéines de type SAM (famille multigénique) participent au transfert de groupements méthyles sur de nombreuses molécules, dont notamment les lignines. La disparition de ces deux spots et la diminution du second, isolé dans le xylème de pin maritime, pourrait être reliées aux modifications qualitatives de la lignine que l'on observe lors d'un stress hydrique (Dixon et Paiva, 1995). L'augmentation de l'accumulation de la protéine chaperonne est en accord avec les données observées dans la littérature, pour différents types de stress. En effet, les protéines de choc thermique de haut poids moléculaire ont été caractérisées comme étant sur-exprimées pour différents types de stress (Waters et al., 1996).

Nous avons donc identifié 148 protéines (soit 12,6% des protéines analysées) réparties sur trois tissus différents, qui présentaient une variation significative au cours du stress hydrique. Nous avons aussi observé des similitudes de position pour la plupart des spots au sein d'un même tissu à deux stades de développement différents (six semaines vs deux ans) mais aussi entre différents tissus (tiges, racines et xylème). Ceci nous a permis, par analogie de position, d'attribuer une fonction à cinq spots présentant une expression différentielle entre les deux conditions et qui semblent impliquer dans la diminution de la photosynthèse (rubisco activase), la modification de la paroi (SAM synthase) ainsi que dans les systèmes de défense (protéines de choc thermique).

## Discussion générale



**Figure 38 :** Positionnement des gènes impliqués dans la réponse au stress hydrique (↑ augmentation, ↓ diminution) au sein des grandes voies métaboliques.

Les programmes d'amélioration génétique des arbres forestiers ont du mal à prendre en compte les caractères d'adaptation à la sécheresse. Lorsque les arbres poussent dans des conditions très limites, le caractère pris en compte est en priorité le taux de mortalité. Mais quand les conditions sont moins difficiles, le taux de mortalité est moins élevé, et le caractère le plus souvent pris en compte est la croissance. Quand les conditions difficiles sont relativement rares et de courte durée, la croissance intègre toutes les variations de l'environnement, et on ne dispose pas d'information directe sur les réactions des arbres à un épisode de déficit hydrique relativement court et de gravité limitée. La disponibilité en eau dans le sol est donc un des facteurs clef qui affectent la croissance des arbres.

Les mécanismes induits par la sécheresse sur le métabolisme des plantes ont été principalement décrits pour des espèces modèles ou de grandes cultures. Cependant les arbres forestiers et notamment les conifères présentent des particularités physiologiques et génétiques qui leur sont propres, liées notamment à leur longévité. On a mis en évidence depuis longtemps l'effet d'un déficit en eau sur les caractéristiques du bois fabriqué à partir du moment où les arbres manquent d'eau. Chez les conifères, cette réaction se traduit par exemple par la fabrication dans le cerne de cellules ayant les caractéristiques de cellules de bois final. Si le déficit en eau apparaît en début de saison de végétation, un anneau de cellules analogues à des cellules de bois final se formera dans le bois initial (ce phénomène est souvent identifié sous le nom de faux cerne).

Les études d'expression portant sur des plants de pin maritime soumis à un déficit hydrique nous ont permis de mettre en évidence des réponses moléculaires à différents niveaux du métabolisme (figure 38). Ces changements semblent être liés soit à un réajustement de l'activité du métabolisme, consécutif à la fermeture des stomates, soit à une réponse active d'acquisition d'une tolérance (figure 39 et 40).

Dans les paragraphes suivant nous discuterons des résultats obtenus au cours de cette thèse et nous tenterons de les comparer à ceux obtenus par séquençage systématique (figure 19) ainsi qu'à ceux obtenus par Costa (1999) au niveau des protéines (nous indiquerons les numéros des spots d'aiguilles de pin maritime qui sont accessibles à l'URL suivante : <http://www.pierroton.inra.fr/genetics/2D/microsequenced.html>).

Nous aborderons successivement les mécanismes impliqués dans la photosynthèse ; la croissance ; la transduction, transcription et traduction ; le métabolisme primaire ; les parois ainsi que dans les mécanismes de défense.



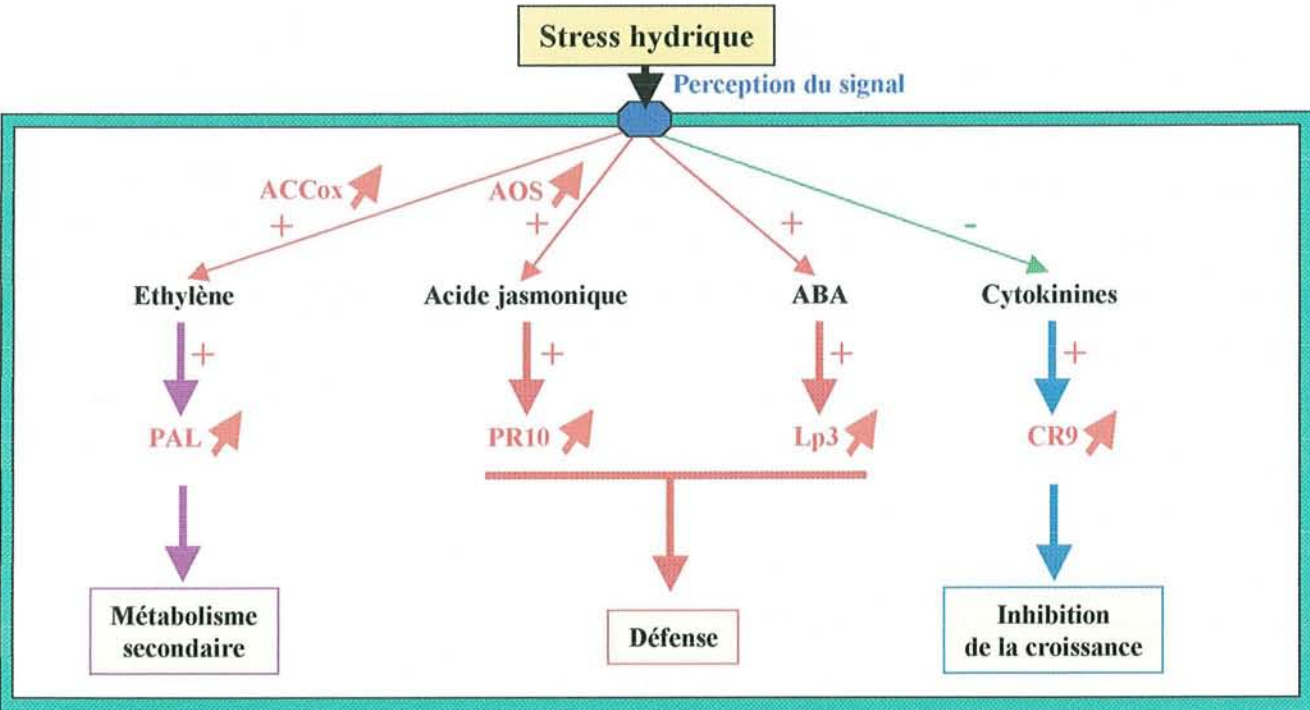


Figure 39 : Positionnement des gènes impliqués dans la réponse au stress hydrique (↗ augmentation, ↘ diminution) via différentes hormones végétales.

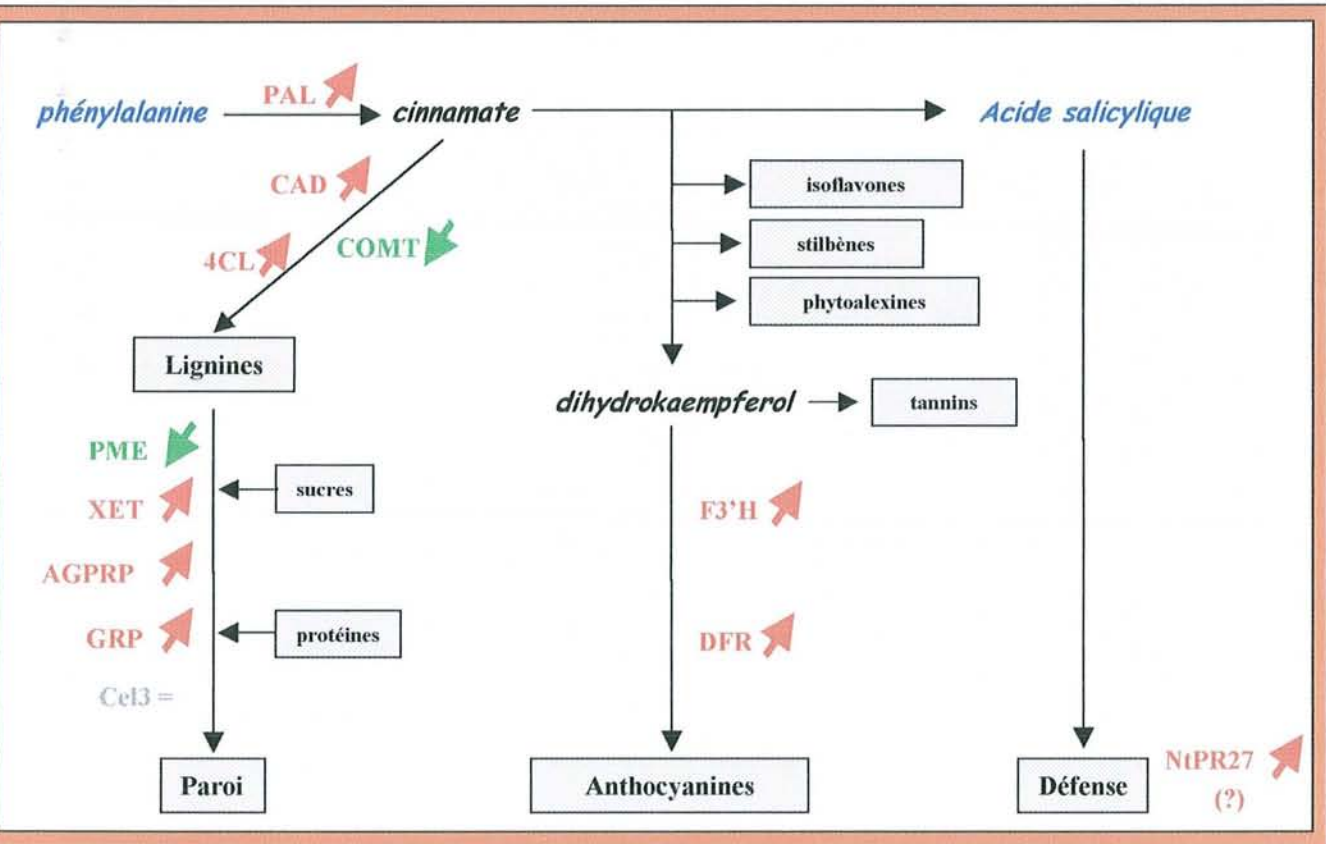


Figure 40 : Positionnement des gènes impliqués dans la réponse au stress hydrique (↗ augmentation, ↘ diminution) au niveau du métabolisme secondaire.

## 1. La photosynthèse

De nombreuses études ont montré une diminution de l'activité photosynthétique, lors d'un stress hydrique, en relation avec la fermeture des stomates (Tabaeizadeh, 1998).

Nous avons mis en évidence des variations dans les niveaux d'expression de gènes impliqués dans la photosynthèse. Les variations observées au niveau de l'expression de ces gènes vont dans le sens d'une diminution de la photosynthèse lors du stress hydrique. Cette diminution a été observée par la mesure des échanges gazeux (conductance stomatique et photosynthèse maximale : Costa, 1999) ainsi que par une diminution du contenu en chlorophylles (Cf. publication n°2). Au niveau de l'expression des gènes, la variation de l'expression des transcrits obtenue sur de jeunes plantules de six semaines conduites en hydroponie va dans le même sens que celle obtenue au niveau protéique par Costa (1999) sur des plants âgés de deux ans élevés en terre.

Nous avons observé une baisse de l'expression de gènes impliqués dans le processus de carboxylation. On pourra citer la petite sous-unité de la rubisCO, qui joue un rôle central dans la nutrition carbonée. Son expression diminue après des temps de stress très courts (1h et 5 h) et se poursuit après 21 jours de stress. Au niveau protéique, après 42 jours de stress, il apparaît que la régulation de cette enzyme se fait *via* une augmentation de sa dégradation (augmentation de l'accumulation des spots N87, N90 et N194 de 50, 80 et 50%, respectivement) et une diminution de la quantité d'enzymes sous forme activée (rubisco activase : spots N54, N55 et N56 qui diminuent de 65, 49 et 36%, respectivement). Cette régulation semble aussi se faire au travers de l'activité enzymatique *via* une diminution de la synthèse de son substrat (diminution de 34% de la quantité du spot N148 correspondant à une phosphoribulokinase). Une autre protéine impliquée dans l'assimilation du CO<sub>2</sub>, présente une accumulation au cours du stress hydrique. Elle correspond à une anhydrase carbonique (spot N140, augmentation de 21%) et est responsable de l'hydratation du carbone. Ce phénomène facilite la diffusion du CO<sub>2</sub> vers le site de carboxylation (Graham et al., 1984) et provoque ainsi sa concentration à l'intérieur des chloroplastes (Fridlyand et Kaler, 1987). Ce mécanisme pourrait être impliqué dans le maintien d'un taux minimal des processus de carboxylation nécessaire à la survie des plants.

Au niveau de la perception de l'énergie lumineuse, nous avons tout d'abord observé une diminution de la quantité de chlorophylles a et b au cours du stress hydrique (Cf. publication

n°2). Nous avons aussi observé une diminution de l'expression des gènes impliqués dans la fixation des chlorophylles au sein des photosystèmes (photocomplexe I : Cab1 ; photocomplexe II : Cab4). Pour ce qui est du processus photochimique, la régulation de l'expression des gènes apparaît beaucoup plus complexe. En effet Costa (1999) a mis en évidence que deux protéines (*Oxygen Evolving Complex*, OEC33 : spot N179 et OEC23 : spot N146) impliquées dans le transfert des électrons lors du processus photochimique, ne présentaient pas de variation d'accumulation au cours du stress hydrique. Ce résultat semble indiquer qu'il existe un maintien d'une quantité minimale de structure appartenant à l'appareil photochimique lors du stress hydrique. Au niveau des transcrits nous avons observé l'augmentation d'une translocase de type SecA. Cette protéine joue un rôle dans le transport et l'adressage des protéines appartenant aux photosystèmes (OEC33, cytochrome f ou plastocyanine). Au cours du stress hydrique, de nombreux composés toxiques sont produits et vont dégrader les structures protéiques ainsi que les membranes. Or nous avons observé la diminution de l'expression d'un gène codant pour une protéine impliquée dans la conservation de l'intégrité des photosystèmes (*Early light Induced Protein*, Bei-Paraskevopoulou et Kloppstech, 1999). Ces résultats semblent indiquer que l'augmentation de l'expression du transporteur de type SecA pourrait être induite par l'augmentation du *turn over* de certaines protéines appartenant aux photosystèmes, telles que OEC33. Ce mécanisme pourrait permettre de maintenir une quantité minimale de structures photosynthétiques pour maintenir une activité minimale afin d'assurer la survie des plantules et/ou en prévision d'une reprise de croissance après le stress.

Les variations que nous avons observées par ces approches ciblées sont en accord avec les résultats issus du séquençage systématique et montrent une diminution globale de l'expression des gènes impliqués dans la photosynthèse (figure 19). Ils représentent 4,75% dans la banque d'ADNc d'aiguilles témoins et 2,12% dans la banque d'ADNc d'aiguilles stressées. On notera la présence de transcrits impliqués dans la photosynthèse au niveau du système racinaire, et le maintien de leur expression au cours du stress. Au niveau énergétique nous n'avons pas observé de variations. La proportion de transcrits impliqués dans l'énergie (Glycolyse ou gluconéogenèse, voie des pentoses phosphate, cycle du TCA, etc.) semble rester stable au niveau des aiguilles, lors du stress hydrique, et légèrement augmenter au niveau du système racinaire.

## 2. La croissance

Suite à l'application d'un stress hydrique et à la diminution de l'activité photosynthétique, le pin maritime ralentit fortement sa croissance, aussi bien au niveau des parties aériennes que racinaires (N'Guyen-Queyrens et al., 1995 – Costa 1999).

Cette diminution de la croissance est le résultat au niveau cellulaire d'une baisse du nombre de divisions cellulaires lors d'un stress hydrique prolongé. Il est probable que le phénomène de diminution de la croissance observée au niveau des plantules de pin maritime soit relié à une diminution de la quantité de cytokinines présentes dans les tissu. Liu et al. (1998) ont observé une baisse de la quantité de cytokinines chez *Pinus sylvestris*, *Pinus koraiensis* ou *Abies holophylla* lors d'un stress salin. Par ailleurs, nous avons isolé, au cours du stress hydrique, un transcrite sur-exprimé codant pour une protéine dont l'expression est inhibée par les cytokinines. Ces résultats confirment l'implication des cytokinines dans les phénomènes de régulation de la croissance.

Nous avons aussi observé une diminution de l'expression de gènes codants pour des protéines histones. Les histones sont principalement impliquées dans la compaction de l'ADN génomique, et leur expression est généralement reliée aux phénomènes de division cellulaire (Bilgin et al., 1999 – Reichheld., 1998). Nous avons observé une baisse de l'activité transcriptionnelle pour les histones de type H1, H2A-2, H2B ,H3 et H4, aussi bien dans les aiguilles et les tiges que dans les racines.

Nous avons aussi mis en évidence deux autres transcrits qui interviennent dans la régulation des divisions cellulaires. Le premier intervient dans les phénomènes de transcription et de maturation des ARNr et de certains ARNm (protéine hélicase/RNaseIII). Son activité a été caractérisée comme directement reliée aux phénomènes de divisions méristématiques (Jacobsen et al., 1999). Le second agit comme une protéine chaperonne dans l'assemblage, le transport ou la dégradation de protéines membranaires (FstH : protéase à atome de zinc ATP dépendante ; Ostersetzer et Adam, 1997).

On notera toutefois que la baisse de la croissance semble se faire aussi *via* une diminution de l'élongation cellulaire (diminution de 53% de l'accumulation d'actine, spot N53) comme cela a été mis en évidence par Costa (1999).

Cette sous-expression des gènes impliqués dans les divisions cellulaires et la croissance a aussi été observée au niveau de la proportion des gènes contenus dans les banques d'ADNc

provenant des parties aériennes et du système racinaire. En condition stressée, on notera une diminution plus marquée de la proportion des transcrits dans les parties aériennes comparés à ceux du système racinaire. Ces résultats sont en accord avec les mesures de croissance réalisées par N'Guyen-Queyrens et al. (1995). En effet, les auteurs ont montré sur des plantules de pin maritime soumis à un stress salin, une diminution plus marquée de la croissance au niveau des parties aériennes qu'au niveau des parties racinaires. Cette différence semble lié à l'implication des racines dans l'assimilation en eau, car le maintien d'une certaine activité cellulaire va permettre aux plantes de prospecter le milieu pour la recherche d'eau.

### 3. Signaux de transduction, transcription et traduction

Suite à l'application du stress, des modifications au niveau de l'expression des gènes se mettent en place (Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 1996). Elles sont induites par des cascades de régulation impliquant les phénomènes de transduction du signal (stress hydrique). Cependant, d'autres cascades reliées aux conditions de bonne alimentation en eau semblent être inhibées par le stress hydrique. C'est ce que semble indiquer la diminution de l'expression d'une nucléoside diphosphate kinase III et d'un facteur de ribosilation de l'ADP. Au niveau de la transcription on peut observer le même comportement. Comme nous l'avons vu précédemment, de nombreux gènes sont sous-exprimés au cours du stress hydrique, et leur transcription semble faire intervenir des facteurs de transcription spécifique de condition hydrique non limitante. En effet nous avons isolé un transcrit codant pour une protéine à doigts de zinc dont l'expression diminue au cours du stress hydrique (clone Pp.rp3). A *contrario*, certains facteurs de transcription apparaissent essentiels à la survie des plantes, et ne semblent pas affectés par le stress hydrique. Ceci a été mis en évidence au niveau protéique pour deux facteurs de transcription : flcA (spots N109) et RanBP1 (spot N173 : *ran binding protein*), par Costa (1999).

La sur-expression du facteur de traduction SUI1 au cours du stress hydrique, montre que la régulation des gènes ne va pas seulement dans le seul sens d'une diminution globale de l'expression, mais plutôt dans le sens d'une réorientation de leur niveau d'expression. En effet, l'induction de certains facteurs de traduction montre que la synthèse des protéines n'est pas totalement inhibée au cours du stress hydrique.

Au niveau des banques d'ADNc on observe deux comportements différents entre les parties aériennes et les parties racinaires. Dans les parties aériennes, le stress semble induire une diminution de la proportion des transcrits impliqués dans la transduction du signal, dans la transcription ainsi que dans la synthèse des protéines. Cela semble indiquer que la majeure partie des signaux de régulation présents au niveau des parties aériennes intervient dans les phénomènes de croissance et de développement. Ces données confirment donc les résultats obtenus par les approches ciblées. Dans le cas du système racinaire, on observe une augmentation, au cours du stress hydrique, des transcrits impliqués dans les cascades de transduction du signal. Ceux impliqués dans la transcription diminuent, alors que ceux impliqués dans la synthèse des protéines restent stables. Ces résultats mettent en avant le rôle prépondérant du système racinaire dans la régulation de l'expression des gènes suite à la perception du stress hydrique. Le système racinaire est aussi impliqué dans les phénomènes d'assimilation des éléments nutritifs, et donc dans la survie des plantules. Ceci peut expliquer la constance que l'on observe au niveau des transcrits impliqués dans la traduction des protéines.

#### 4. Le métabolisme primaire

Suite au stress hydrique, de nombreux changements se produisent au niveau de l'expression des gènes, qui se répercutent au niveau du métabolisme primaire (Deepika et Anil, 1999).

La diminution de l'activité photosynthétique induite par la fermeture des stomates provoque une augmentation de la photorespiration. Un des enzymes clef impliqué dans ce processus est la glycolate oxydase qui est sur-exprimée au cours du stress, aussi bien dans les parties aériennes que dans le système racinaire. Ce mécanisme a pour effet d'induire un stress oxydatif au sein de la cellule *via* la production d'eau oxygénée (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

La diminution du métabolisme azoté (glutamine synthase : spot 47:48 diminution de 38% et spot N46 diminution de 32%) peut également induire une diminution de la croissance comme cela a été mis en évidence chez le maïs par Foyer et al. (1998). Nous avons aussi observé des variations au niveau du métabolisme du phosphate (induction de l'expression d'une acide phosphatase).

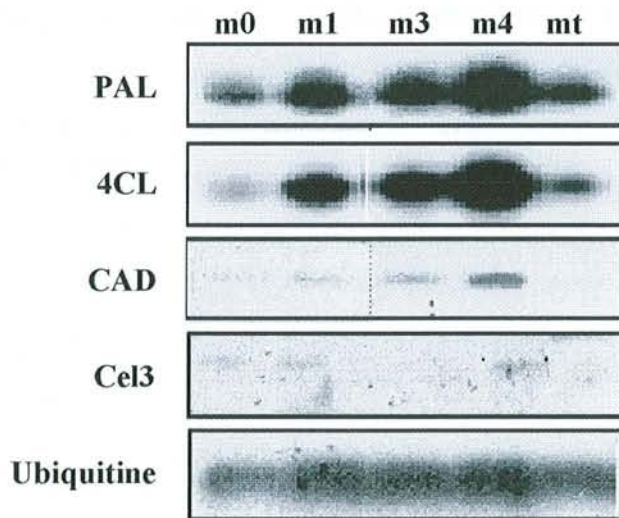
Néanmoins, la régulation des différentes voies métaboliques au sein de la cellule passe par la régulation du pH des différents compartiments cellulaires et par la production d'énergie *via* la synthèse d'ATP. Ainsi la sur-expression au niveau transcriptionnel (clone Pp.ap19) et

traductionnel (spot N120, sous-unité  $\delta$ , augmentation de 80%) des gènes codants pour des ATPases en est un exemple. Ces augmentations d'expression permettent probablement de maintenir une activité minimale pour la survie de la cellule. Cette production d'énergie peut être couplée aux variations du métabolisme carboné. Nous avons par exemple observé la sur-expression d'une formiate déshydrogénase NAD dépendante (mitochondries). Cet enzyme catalyse la transformation du formiate en  $\text{CO}_2$ , via l'assimilation d' $\text{O}_2$  et la production d'ATP. Il joue un rôle central dans le métabolisme C1 pour la synthèse d'acides aminés (e.g. Serine, Glycine et Methionine), des purines, de sucres et de certains acides organiques (Cossins, 1980).

Un des métabolismes qui apparaît fortement régulé au cours du stress hydrique est celui des sucres. Un des sucres préférentiellement accumulés chez les plantes soumises à un stress hydrique est le saccharose. Cela semble être aussi le cas chez le pin maritime (sur-expression d'une saccharose phosphate synthase et d'une saccharose synthase). Le saccharose peut agir en tant que composé soluble compatible et son accumulation peut permettre d'éviter la cristallisation des molécules contenues dans la cellule. Elle limite donc les dommages au niveau des structures cellulaires (Williams et Leopold, 1989). Bien que les sucres aient une action d'osmolites, ils peuvent aussi avoir un rôle dans la transduction du signal et dans la division cellulaire. C'est le cas de deux autres transcrits codants pour le même gène qui ont été isolés au niveau des parties aériennes et du système racinaire. Ils correspondent à une protéine de type GRR1 (*Glucose Regulated Repressor*). Cette protéine intervient dans les cascades de transduction qui font intervenir le glucose, dans la dégradation des protéines ubiquitinilées (cyclines) et donc dans la régulation du cycle cellulaire.

Le transfert de groupement méthyle sur différents types de substrats semble jouer un rôle central dans la régulation des différentes voies métaboliques, notamment en condition de stress hydrique. En effet, nous avons observé la sur-expression d'une S-adénosyl-l-homocystéine hydrolase. Deux autres enzymes (S-adénosyl méthionine) impliqués dans ce métabolisme ont été identifiés par Costa (1999). Le premier, correspondant au spot N127 s'accumule fortement au cours du stress (310%). Le second spot (N155) ne présente quant à lui pas de variation. Ceci met en avant la complexité de cette voie.

D'autres transcrits présentant des variations d'expression vont dans le sens d'une diminution du métabolisme primaire. Ces gènes sont impliqués dans la protéolyse (sous-expression d'une



**Figure 41** : RT-PCR de quatre gènes impliqués dans la formation de la paroi cellulaire. 15 cycles d'amplification ont été réalisés pour chacun des échantillons. Pour chacune des expériences, l'ubiquitine a été utilisée comme contrôle interne dans la PCR. Les échantillons ont été analysés après trois semaines de stress au PEG ; m0 : -0,08MPa, m1 : -0,15MPa, m3 : -0,45MPa et m4 : -0,60MPa. Nous avons utilisé comme témoins des échantillons provenant de plantules poussant en terre en bonne condition d'alimentation en eau.



*ubiquitin conjugaison enzyme E2*), la synthèse des protéines (sous-expression d'une protéine ribosomale 40S), l'élimination de l'excès d'ions métalliques non utilisés pour le maintien d'activités enzymatiques (sous-expression d'une métallothionéine de type 15 et sur-expression d'une métallothionéine de type 1, Meinhart, 1996) ou dans le métabolisme général (sous-expression d'une monooxygénase à cytochrome P450 et sur-expression d'une noduline).

Au niveau des banques d'ADNc on constate une diminution très marquée du métabolisme, uniquement au niveau des parties aériennes (de 23,2% à 13,8%). Cependant on observe un comportement opposé au niveau racinaire (de 17,6% à 19,5%). Cette augmentation au niveau des racines est liée à l'induction du métabolisme secondaire. Les variations observées à ce niveau sont à mettre en relation avec la diminution de l'activité photosynthétique et le ralentissement de la croissance.

## 6. Les parois

Une des modifications majeures induite par le stress hydrique se produit au niveau de la paroi de la cellule végétale. Elle conduit à l'épaississement (ou au renforcement) de cette dernière. La lignine est l'un des composés majoritairement accumulés lors de cet épaississement. De nombreuses études ont montré l'induction des gènes impliqués dans la voie des phénylpropanoïdes, et plus particulièrement dans la biosynthèse des monolignols, notamment chez *Pinus taeda* (Chang et al., 1995). Chez le pin maritime, nous avons observé le même type de variation d'expression pour trois gènes impliqués dans cette biosynthèse (figure 41). Il s'agit de la PAL (phényle ammonia liase), de la 4CL (4-coumarate CoA ligase) et de la CAD (cinnamyl alcool déshydrogénase). Au niveau protéique, Costa (1999) a observé une sur-expression de la CCoA-OMT (caféoyl CoA-O-méthyltransférase, spot N125, augmentation de 328%) et d'une COMT (caféique-O-méthyltransférase, spot N177, augmentation de 50%).

Des modifications pariétales se produisent aussi au niveau qualitatif. Ainsi, des modifications dans la composition de la paroi ont été observées lors de différents types de stress (Dixon et Paiva, 1995). Au cours de notre étude nous avons observé une diminution de l'expression d'une caféique-O-méthyltransférase (COMT) au cours du stress hydrique. Ce résultat pourrait indiquer que l'on a à faire à deux isoformes codants pour la COMT, l'un impliqué dans la

croissance (clone Pp.rp2) l'autre dans la tolérance au stress hydrique (N177), ou une complète déconnection de la régulation du même gène au niveau du transcrit et de la protéine.

Certains composés (ex : cellulose, hémicellulose, pectine) présentent des variations qualitatives et quantitatives au cours du stress hydrique. Les variations d'expression de ces différents gènes, associées à ceux de la biosynthèse des lignines, semblent liées aux modifications des propriétés physico-chimiques des parois induites par le stress hydrique, telles que l'extensibilité (Braam et al., 1997). Il semblerait que l'allocation du carbone pariétal se fasse en faveur de la lignine et aux dépens de la cellulose. En effet nous n'avons pas observé de variation d'expression pour une cellulose synthase (Cel3, figure 41). Ce renforcement de la paroi cellulaire, par une augmentation de la quantité de lignine par rapport à la quantité de cellulose, pourrait permettre à la cellule de maintenir sa turgescence et ainsi de limiter les pertes en eau.

Nous avons également observé : (i) l'augmentation de l'expression d'un gène impliqué dans la formation de l'hémicellulose (XET : xyloglucane transglucosidase) qui intervient dans la modification des liaisons entre les polymères de xyloglucane, (ii) la diminution de l'expression d'une pectine méthylestérase dont la diminution de l'expression peut être due à des modifications des pectines, (iii) la sous-expression de deux transcrits homologues à des gènes impliqués dans la formation du xylème secondaire chez *Pinus taeda*, (PtaGRP2 : *Glycine-rich protein* et PtaGRP4 : *Arabinogalactan/prolin-rich protein*).

Au niveau des banques d'ADNc d'aiguilles et de racines stressées, nous constatons une diminution de la proportion des gènes impliqués dans la biosynthèse et le dépôt des composés pariétaux (hors voie de biosynthèse des lignines). Cette diminution peut être reliée aux modifications qualitatives de la paroi.

Au niveau racinaire, on observe une augmentation de la proportion de transcrits impliqués dans le métabolisme secondaire, au sein duquel la proportion de transcrits impliqués dans la biosynthèse des lignines augmente (ex : ferulate hydroxylase). Au niveau des parties aériennes, les variations semblent suivre un comportement opposé.

Pour la section correspondant aux gènes pariétaux (hors lignification), on constate pour les parties aériennes que 25% de ces clones séquencés dans la condition témoin correspondent à la cellulose synthase. Or ce transcrit voit sa proportion chuter au cours du stress (aucun clone séquencé). Au niveau racinaire, nous n'avons pas observé de variation. Ces résultats

confirment les résultats obtenus par RT-PCR et indiquent une diminution de la quantité de cellulose comparée à celle des lignines.

## 7. Les mécanismes de défense

Une des réponses largement répandues chez les végétaux soumis à un stress hydrique provient directement de la fermeture des stomates. En effet, suite à la fermeture des stomates et à la diminution de la carboxylation, on observe une augmentation des espèces activées de l'oxygène car le processus photochimique ne s'arrête pas. Ces radicaux sont extrêmement toxiques pour les structures cellulaires et induisent un stress oxydatif. Des mécanismes de détoxication de la cellule sont alors sollicités pour éliminer ces molécules. Costa (1999) a observé une augmentation de l'accumulation au cours du stress hydrique d'une glutathione peroxydase (spot N142, 90%) et d'une ascorbate peroxydase (spot N175, 40%). Les mécanismes de détoxication peuvent agir à d'autres niveaux. En effet les espèces activées de l'oxygène vont induire une peroxydation des lipides membranaires, favorisant ainsi la production d'aldéhydes. Nous avons observé l'induction de la transcription, au cours du stress hydrique, d'un gène impliqué dans l'élimination de ces composés (aldéhyde déshydrogénase de type 3). Cependant la régulation des enzymes responsables de la détoxication semble complexe, comme l'illustre le résultat obtenu sur le pin maritime montrant une diminution (Costa, 1999) ou une augmentation (Costa et al., 1998) de l'accumulation d'une Cu/Zn SOD (superoxyde dismutase, spot N95) au cours du stress.

Comme nous l'avons vu précédemment, le stress hydrique va moduler l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme secondaire, notamment au niveau de la biosynthèse des flavonoïdes. L'augmentation de la quantité de flavonoïdes a été décrite chez de nombreuses espèces végétales consécutivement à un déficit d'alimentation en eau (Ingram et Bartels D, 1996 - Kennedy and Filippis., 1999). Nous avons ainsi observé une augmentation de l'expression d'une dihydroflavonol 4-réductase et d'une flavonoïde 3'-hydroxylase. Un autre enzyme impliqué dans le métabolisme secondaire a été caractérisé comme induit par le stress hydrique par Costa (1999). Il est impliqué dans la synthèse de flavones (isoflavone réductase, spot N75, augmentation de 20%). Ces résultats, associés aux modifications de l'expression des gènes impliqués dans la biosynthèse des lignines, mettent en évidence l'implication de la voie des phénylpropanoïdes dans la réponse au déficit hydrique.

Bien que nous ne disposions pas de mesure sur la variation du taux d'ABA au cours du stress hydrique, il semblerait que cette hormone puisse jouer un rôle dans la régulation de l'expression des gènes lors d'un stress hydrique chez le pin maritime. En effet, nous avons isolé un transcrite homologue à la famille de gènes *Lp3* de *Pinus taeda* inductibles par le stress hydrique ainsi que par l'ABA, notamment au niveau du système racinaire. La régulation de cette famille de gènes impliqués dans la tolérance au stress hydrique reste complexe, car l'expression des différents membres varie selon les tissus (Padmanabhan et al., 1997). Le même type de spécificité tissulaire a été observé chez le pin maritime avec la sur-expression d'un homologue au niveau du système racinaire (clone Pp.rp6). Au niveau des protéines d'aiguilles, Costa (1999) a mis en évidence la diminution de l'accumulation d'un isoforme (spot N172, diminution de 37%) alors qu'un second ne présentait pas de variation (spot N143).

Une deuxième hormone qui semble jouer un rôle dans la signalisation du stress hydrique chez le pin maritime est l'acide jasmonique. Là encore nous ne disposons pas de mesure quant à la variation de sa quantité. Cependant nous avons isolé un transcrite qui intervient dans sa biosynthèse (allène oxyde synthase). L'implication de l'acide jasmonique dans la réponse au stress hydrique est étayée par la sur-expression d'un deuxième transcrite correspondant à une *pathogenesis related protein* de type 10 (Clone Pp.ap11 : PR-10 protéine, Dubos et Plomion., 2001 : publication n°3). L'induction des protéines PR-10 a déjà été caractérisée comme étant sous la dépendance de cette hormone (Moons et al., 1997). L'induction de PR protéine de type 10 semble faire partie de la réponse du pin maritime à un stress hydrique, comme cela a été décrit chez *Betula pendula* (Paakkonen et al., 1998). Une deuxième protéine PR a été isolée et présente elle aussi une induction de son expression lors du stress hydrique (NtPRP27 ; Okushima et al., 2000). Une troisième hormone qui semble intervenir comme messager dans de transmission de la perception du stress correspond à l'éthylène. C'est ce que semble indiquer la sur-expression d'une protéine de type oxydase qui présente une forte homologie avec une ACC oxydase. Cette hormone est notamment impliquée dans la sénescence des feuilles, la formation des tiges et la croissance des racines (Zarembinski et Theologis, 1994). Elle est synthétisée au niveau des racines (siège de la perception du stress hydrique) puis transportée vers les parties aériennes (lieu de la photosynthèse ; Tudela et Primo-Millo, 1992). Il se pourrait donc que cette hormone agisse dans le sens de

l'épaississement des parois, et peut-être dans la perte d'aiguilles pour limiter les dommages liés au stress oxydatif.

Enfin on constate que, comme pour de nombreuses plantes, le pin maritime présente une augmentation de l'expression de gènes codants pour des protéines de choc thermique (DnaJ : Hsp70). Ces *Hsp* jouent un rôle dans le maintien de l'intégrité des protéines. Le même type de variation d'expression a été observé au niveau protéique pour trois *Hsp* par Costa (1999). Il s'agit de deux *Hsp* de faible poids moléculaire (N98 et N144, qui doublent) et d'une Hsp70 (N166) qui augmente de 15%.

Enfin on notera que certains gènes induits au cours d'autres types de stress peuvent être réprimés lors du stress hydrique. Cela semble être le cas pour une protéine antimicrobienne (AMP1, Thevissen et al., 2000) et pour une protéine LEA hydrophobe.

## 8. Conclusion

L'étude de l'expression des gènes et des protéines utilisant des approches ciblées (ADNc-AFLP et électrophorèse bidimensionnelle des protéines) et aléatoires (séquençage d'EST) nous a permis de mieux cerner la réponse moléculaire mise en place par le pin maritime lors d'un déficit d'alimentation en eau. Les gènes de fonctions connues que nous avons isolés par les approches ciblées correspondent à des gènes communément impliqués dans la réponse et/ou la tolérance au stress hydrique. Le séquençage systématique nous a permis de mettre en évidence les tendances générales qui interviennent au niveau de la régulation des grandes fonctions métaboliques. Cependant, dans aucune de ces trois études nous n'avons mis en évidence la sur-expression de déhydrines, de *lea* ou bien d'*ABA-responsive (rab) genes*, au cours du stress hydrique. Enfin, plus de la moitié des transcrits qui ont été identifiés par ADNc-AFLP correspond à des gènes de fonction inconnue. Cet ensemble de séquences constitue un réservoir d'informations qui pourra fournir de nouvelles indications quant aux variations métaboliques et aux mécanismes de défense qui sont induits au cours de la tolérance à un stress hydrique.

## CHAPITRE 4

### Conclusions et Perspectives

## Conclusions

La première partie de ce travail a consisté à mettre au point un système de culture où les conditions hydriques pouvaient être contrôlées de manière très précise. Pour cela, nous avons utilisé des cultures en hydroponie et utilisé le PEG 3500 comme osmoticum.

Nous avons mesuré plusieurs paramètres biochimiques au niveau des parties aériennes pour caractériser le stress. Une baisse du contenu en chlorophylle a et b, ainsi qu'une augmentation de la quantité d'acide linoléique et du degré d'insaturation des acides gras membranaires (qui rend compte des changements de fluidité des membranes lors d'un stress hydrique) ont été observées. Aucune variation des terpènes, tant au niveau qualitatif que quantitatif, n'a été observée.

Dans un second temps, il nous a fallu adapter aux tissus quelque peu récalcitrants du pin maritime, l'extraction et la manipulation des ARN. Disposant d'ADNc de bonne qualité, nous avons utilisé la technique d'ADNc-AFLP pour étudier le transcriptome de jeunes plants de pin maritime soumis à un stress hydrique. Cette technique présente l'avantage d'être à la fois rapide et reproductible pour l'isolation et l'étude de l'expression de nombreux gènes. Nous l'avons optimisé en utilisant la coloration au nitrate d'argent qui permet d'analyser visuellement de nombreux transcrits en une seule journée de travail.

Ainsi, de nombreux gènes dont l'expression était sur- ou sous-exprimée entre une condition non stressée et une condition stressée ont été clonés et séquencés à partir des profils d'expression obtenus pour les parties racinaires (33 fragments montrant une variation de type présence/absence) et pour les parties aériennes (48 fragments).

Au niveau des parties racinaires, les EST de fonctions connues se répartissaient en quatre grandes catégories correspondant : (i) aux processus d'inhibition de la croissance en réponse au déficit hydrique (histone H2B, protéine de division cellulaire FtsH), (ii) aux changements du métabolisme résultant de la fermeture des stomates, de la diminution de la transpiration et de la photosynthèse (aldéhyde déshydrogénase, glycolate oxydase, ATPase, translocase SecA, S-adenosyl-l-homocystéine hydrolase), (iii) à l'activation des mécanismes cellulaires de la tolérance (*Lp3* : gène inductible par l'ABA, formate déshydrogénase, LEA de type hydrophobe) et des modifications pariétales (COMT : acide caffeic ortho-méthyltransférase,

XET : xyloglucane endo-transglycolase) et (iv) aux éléments qui interviennent dans la régulation des gènes (protéine à doigt de zinc) ou dans la synthèse des hormones (protéine de type oxydase : ACC oxydase).

Au niveau des parties aériennes, les gènes ont été classés selon leur implication dans : (i) la photosynthèse (translocase SecA, protéines de type Cab1 et Cab4, petite sous unité de la rubisCO), (ii) la croissance et le développement (protéine CR9 réprimée par les cytokinines, CAF : ARN hélicase/RNase III), (iii) les signaux de transduction et la traduction (ARF : facteur de ribosylation de l'ADP, NDK : nucléoside diphosphate kinase, SUII : facteur d'initiation de la traduction), (iv) les différents métabolismes (phosphatase acide, protéine de type noduline, glycolate oxydase, métallothionéine) dont celui des sucres (GRR : protéine régulée par le glucose, SPS : sucrose phosphate synthase, Susy : sucrose synthase), (v) la modification des parois (PME : pectine méthyle estérase, GRP : protéine riche en glycine, AGP : protéine riche en proline et arabinogalactane) et (vi) les mécanismes de défense (F3'H : flavonoïde 3'-5'hydroxylase, DFR ; dihydroflavol 4-réductase, PR protéines : NtPR27 et PR-10, AOS : allène oxyde synthase, Glucan endo-1,3-beta-glucosidase).

A partir des fragments isolés par l'ADNc-AFLP, nous avons pu déterminer la séquence codante complète de 13 gènes dont 7 membres appartenant à la famille des histones.

La majeure partie des EST de fonctions connues que nous avons isolée au cours du stress, correspondait à des gènes déjà décrits comme étant affectés par des stress abiotiques chez d'autres espèces de plantes. Cependant, nous n'avons pas, à l'exception d'une LEA hydrophobe, identifié les gènes classiquement impliqués dans les phénomènes de tolérance à la déshydratation : déhydrines, LEA, *rab*.

Par ailleurs, certains des gènes de fonctions connues n'ont jamais été décrits comme étant affectés par la sécheresse dans d'autres organismes (ex : translocase secA, protéine de type noduline, facteur d'initiation de la traduction) ce qui montre que les arbres peuvent être une source intéressante pour la découverte de nouveaux gènes impliqués dans la réponse adaptative au stress hydrique. En effet, nous avons par exemple isolé un fragment correspondant à une protéine LEA hydrophobe, dont très peu de membres ont été caractérisés, que ce soit chez les plantes ou les levures. De plus, pour certains d'entre eux, nous avons pu



étudier la spécificité de leur expression tissulaire, ce qui apporte des informations supplémentaires à la caractérisation des gènes.

La forte proportion de gènes codants pour des protéines hypothétiques (19%) ou pour de nouvelles séquences (33%) met en évidence le manque d'informations dont on dispose sur les mécanismes moléculaires de la réponse au stress hydrique chez les plantes.

A chaque fois que nous avons vérifié l'expression des gènes correspondant à nos fragments différentiels (c'est-à-dire dans 40% des cas), par northern ou RT-PCR, le résultat obtenu par ADNc-AFLP était confirmé. Ceci démontre clairement que cette technique présente l'avantage de produire de très nombreux fragments correspondant à des gènes dont l'expression est réellement différentielle au cours du stress hydrique.

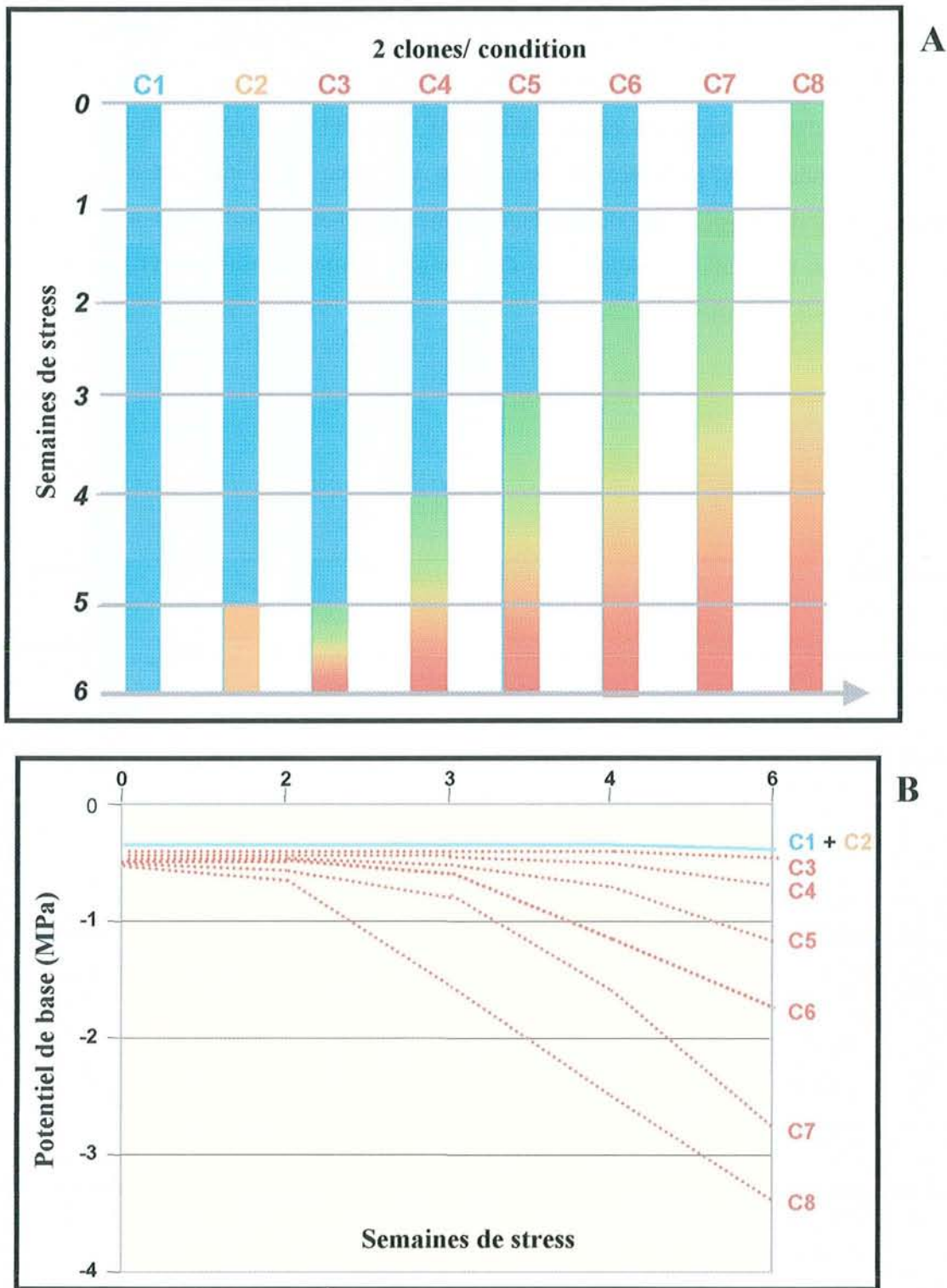
L'implication dans la tolérance à un déficit hydrique de gènes identifiés dans cette étude restera à vérifier, que ce soit par la mise en œuvre de méthodes de génétique classique ou de génétique inverse.

Enfin, dans un troisième temps nous nous sommes intéressés aux variations du protéome dans trois tissus différents (aiguilles, tiges et racines). Nous avons utilisé pour cette expérience les mêmes échantillons que précédemment. Nous avons observé qu'une minorité de spots présentait une variation entre les deux conditions (8% pour les aiguilles, 14% pour les tiges et les racines).

Par ailleurs, nous avons observé des comportements d'expression opposés entre les aiguilles, les tiges et les racines. En effet, près de 60% des spots analysés dans les aiguilles ont une intensité qui diminue au cours du stress, en même temps que l'activité photosynthétique. *A contrario*, on observe dans les tiges et les racines une augmentation de l'intensité pour 60% des spots, parmi lesquels 25% et 62% correspondent à des apparitions, respectivement. Ceci semble traduire des phénomènes adaptatifs impliqués dans les réponses au stress.

Enfin, nous avons pu attribuer une fonction à cinq spots en comparant nos gels à ceux obtenus dans des expériences précédentes (Plomion et al., 2000). Ces spots correspondent à une rubisco activase, une protéine de choc thermique de haut poids moléculaire (Hsp70), deux SAM synthase, et une protéine de choc thermique de faible poids moléculaire.

L'obtention de séquences protéiques combinées à un séquençage d'EST plus exhaustif (20 000 le seront dans le cadre du projet LIGNOME), devrait nous permettre d'isoler les transcrits correspondant aux protéines qui présentent des variations d'intensité au cours du stress. Ainsi, il serait possible de valider leur implication dans la tolérance à un déficit hydrique en utilisant les mêmes méthodes que celles mises en œuvre pour les gènes identifiés à partir de l'analyse des transcrits.



**Figure 42 :** Plan expérimental. **A)** : Cinétique de prélèvement des aiguilles, tiges et racines de plants poussant en terre. (■) : Arrosage, (■) : arrêt d'arrosage, (■) : traitement à l'ABA ( $18\mu\text{M}$ ). **B)** : Moyenne, au cours du temps, des mesures du potentiel de base pour chacune des conditions. Ces tissus serviront pour la préparation de sondes afin de caractériser les EST isolés en cultures hydroponiques.

Deux grandes pistes de recherches peuvent se dégager des résultats présentés dans ma thèse. La première vise à poursuivre la caractérisation des gènes identifiés : quelle est la fonction des gènes inconnus ? Quels sont ceux qui sont réellement impliqués dans la tolérance au stress ? La deuxième vise dans un premier temps à identifier de façon plus exhaustive l'ensemble des gènes impliqués dans la réponse au stress hydrique chez le pin maritime, et dans un second temps s'attachera à répondre aux mêmes questions. Ces deux pistes nécessiteront l'utilisation d'outils ou de méthodes communes (analyse d'expression des gènes, cartographie génétique, détection de QTL, transformation génétique) que nous décrivons ci-dessous.

## **1. Etude d'expression**

### **1.1. Caractérisation complémentaire des gènes identifiés dans la thèse**

#### **1.1.1. Validation des niveaux d'expression sur des plants élevés dans un milieu naturel**

Les clones qui ont été isolés au cours de ma thèse provenaient de plantules soumises à un stress hydrique en hydroponie. Ces conditions ne reflètent peut-être pas exactement le stress hydrique subi dans le milieu naturel. Il faut cependant noter que l'expression des gènes semble identique entre les deux contrôles non stressés : plants en terre bien arrosés et plants en milieu de Seillac sans PEG. Ceci a été vérifié sur huit gènes. Il nous faudra maintenant comparer les niveaux d'expression de tous les gènes dans les conditions stressées en hydroponie et en terre. Pour cette caractérisation, nous proposons d'utiliser la technique de filtre à ADNc. L'ensemble des gènes déposé sur une seule membrane pour suivre, par northern inverse, leur variation d'expression dans différentes conditions de stress. Il suffira alors d'utiliser des sondes d'ARN totaux issues de plants stressés en terre et en hydroponie.

Dans cette optique, nous avons réalisé une expérience « préparatoire » sur 16 boutures du même génotype âgées de deux ans, poussant en serre dans des pots de quatre litres contenant un mélange de tourbe, de sable et de terre (1/3, 1/3, 1/3). Une fois les boutures mises à la capacité au champ, le stress hydrique a été appliqué par simple arrêt d'arrosage. Dès que les plants ont été soumis au stress, la base du pot a été recouverte d'un couvercle étanche afin de limiter les pertes en eau par évaporation. En pratique, toutes les semaines, et ce pendant six semaines, deux clones ont cessé d'être arrosés (figure 42.A). A la fin de l'expérience, tous les

---

clones ont ainsi pu être prélevés en même temps. Nous disposons donc d'une cinétique, où les plants ont subi un arrêt d'arrosage pendant 1, 2, 3, 4, 5, et 6 semaines. L'intérêt d'une telle expérience est de ne pas rajouter au traitement appliqué (le stress hydrique), une source de variation supplémentaire : la maturation des plants.

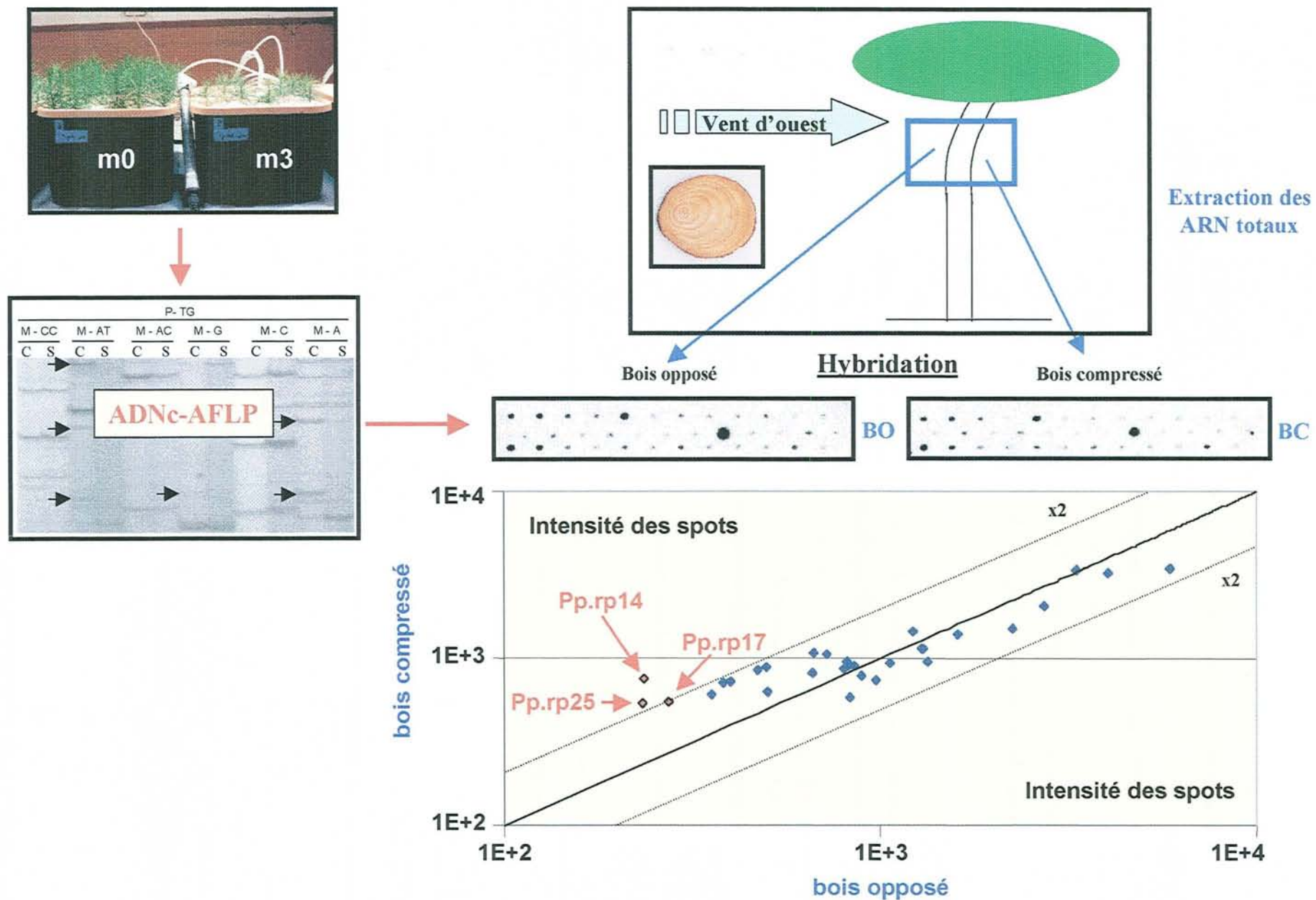
Deux plants ont été traités au cours de la dernière semaine à l'acide abscissique (ABA 18 $\mu$ M). Un premier traitement a été réalisé à la fois par arrosage et par aspersion de l'appareil végétatif, suivi trois jours plus tard d'un deuxième traitement appliqué uniquement par aspersion. Enfin, deux plants témoins ont été arrosés une fois par semaine, tout au long de l'expérience.

Le stress hydrique a été caractérisé par la mesure hebdomadaire du potentiel de base (état de stress des plantes, figure 42.B) et par pesées des pots (consommation en eau des plantes). Les aiguilles, le xylème et les racines ont été prélevés séparément, congelés dans de l'azote liquide et stockés à  $-80^{\circ}\text{C}$ . A partir de ces trois tissus, les ARN pourront être isolés afin de synthétiser des sondes pour les hybridations sur filtre.

### 1.1.2. Caractérisation plus fine des gènes

De manière complémentaire, il serait intéressant de connaître le niveau d'expression de nos gènes sur des plants soumis à d'autres stress. Pour ce faire, des sondes pourraient être obtenues sur des plants ayant subi (i) des stress abiotiques (thermique, froid, mécanique, etc.) ou biotiques (attaque d'insecte, de champignon), (ii) des traitements utilisant des facteurs de croissance : hormones de stress (acide abscissique, éthylène, acide jasmonique) ou de croissance (cytokinines, gibberelines), et (iii) différents traitements utilisant des inhibiteurs de facteurs de croissances ou des inhibiteurs de leurs récepteurs (ex : 1-MCP pour le récepteur de l'éthylène). Des sondes pourraient également être synthétisées à partir de différents types de tissus (pollen, mégagamétophyte, fleur, aiguille, racine, phloème, xylème, cambium, méristème apical), et plus simplement à partir de génotypes tolérants et sensibles au stress hydrique.

Bien que ces expériences ne permettront pas de déterminer la fonction *sensus stricto* des gènes inconnus, elles contribueront à les caractériser plus finement. Notamment le traitement multivarié des données d'expression (analyse des corrélations, Plomion et al., 2000 ;



**Figure 43** : Filtres à ADNc. Analyse de l'expression de 30 TDF isolés dans les parties racinaires de jeunes plants de pin maritime soumis à un stress hydrique. Les sondes correspondent aux ARN totaux de xylème récolté sur les faces opposé (BO) et compressé (BC) de l'arbre.

classification, Eisen et al., 1998) permettra d'accéder au concept d'homologie de régulation des gènes. Par ailleurs, la faible quantité d'ARN nécessaire pour la synthèse des sondes (RT-PCR) devrait faciliter une telle approche. Ce type d'analyse pourrait donc permettre, à un coût relativement faible, de mieux caractériser un grand nombre de nos clones inconnus.

Une expérience préliminaire a été réalisée dans ce sens. Elle a consisté à analyser les variations d'expression des TDF (Transcript Derived Fragment) « racinaires » dans le xylème de pin maritime. L'arbre à partir duquel le xylème a été isolé était âgé de 30 ans. Le xylème a été collecté en haut de l'arbre (bois juvénile) sur les faces : compressée (BC : bois de réaction formé sous l'action du vent d'ouest) et opposée (BO). Les tissus mis en place dans ces deux types de bois diffèrent d'un point de vue anatomique (angle des microfibrilles de cellulose plus élevé dans le BC), chimique (plus de lignine, moins de cellulose dans le BC) ainsi qu'au niveau de leurs propriétés physiques (bois plus dense et retraits longitudinaux plus importants dans le BC). Les ARNm de ces deux tissus ont été extraits, rétro-transcrits en ADNc, puis utilisés comme sonde après un double marquage au  $^{32}\text{P}$  (dATP et dCTP). 30 TDF racinaires ont été déposés sur une membrane de nylon (100ng par TDF), et ont ensuite été hybridés avec les deux types de sondes (1 $\mu\text{g}$  d'ARN total). La membrane a été scannée à l'aide du *Personal Molecular Imager* (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) et l'intensité des spots analysée à l'aide du logiciel *Quantity One* (Bio-Rad Laboratories). Si l'on considère seulement les variations supérieures ou égales à 200% entre les deux conditions, trois fragments (Pp.rp14, Pp.rp17 et Pp.rp25) présentent une expression différentielle significative entre ces deux tissus (Figure 43). Deux TDF (Pp.rp14 et Pp.rp25) correspondent à des séquences qui ne présentent pas d'homologie sur les bases de données, le troisième (Pp.rp17) correspond à une protéine oxydase. Ainsi, ces TDF semblent exprimés de manière différentielle non seulement dans des racines soumises à un stress hydrique, mais aussi dans du xylème soumis à un stress mécanique. Les variations observées vont dans le même sens dans les deux types de stress : augmentation de la quantité de transcrits dans les tissus stressés. Ce résultat pourrait indiquer une implication dans la réponse au stress hydrique *via* la modification des parois du xylème, car on sait qu'elles ont des caractéristiques très différentes entre le BO et le BC. Mais cela ne reste qu'une hypothèse.

---

## 1.2. Identification plus exhaustive des gènes impliqués dans la réponse au stress hydrique

### 1.2.1. Exploitation du séquençage systématique d'EST

En parallèle de mes travaux, quatre banques non normalisées d'ADNc ont été réalisées à partir d'aiguilles et de racines des mêmes plantules de pin maritime stressées (condition : m3, t3 : -0,45MPa, 21 jours de stress) ou non stressées (m0, t3 : -0,08MPa, 21 jours après le début du stress). 2078 clones ont déjà été séquencés et placés dans une base de données. Les premières analyses d'expression basées sur la fréquence d'apparition d'un transcrit (northern *in silico*, J-M Frigerio, communication personnelle) entre les deux conditions (au sein d'un même tissu) montrent que (figure 19, page 37) :

- au niveau des aiguilles stressées : on observe une augmentation du pourcentage d'EST dont la fonction correspond au système de défense, et une diminution des EST correspondant à la photosynthèse, au métabolisme, à la synthèse et l'adressage des protéines, à la transduction du signal et à la transcription. Les EST dont la fonction est impliquée dans l'énergie, le transport et la structure cellulaire restent constants.
- au niveau des racines stressées : on a une augmentation du pourcentage d'EST dont la fonction correspond au métabolisme, à l'énergie, au transport, à la transduction du signal, et une diminution des EST correspondant à la défense, à la transcription, à la synthèse et l'adressage des protéines, à la croissance et à la structure cellulaire.

Par ailleurs, les banques d'ADNc de racines présentent moins de redondances que celles des parties aériennes. Elles contiennent moins de gènes (en pourcentage) impliqués dans la photosynthèse et les réactions de défense. *A contrario*, on observe une augmentation du pourcentage de gènes impliqués dans le métabolisme secondaire, le transport, l'adressage des protéines, la transduction du signal, la transcription, la croissance et les structures cellulaires. Ainsi les EST isolées des racines seraient impliquées d'une manière plus générale dans la transmission du signal et dans les variations du métabolisme et du développement.

Le système racinaire étant le siège de l'assimilation en eau et de la perception primaire du stress hydrique, c'est sur ce tissu que les efforts supplémentaires de séquençage devront être



**Tableau 5** : Récapitulatif des fragments d'ADNc isolés par la technique d'hybridation suppressive et soustractive (SSH).

Clone	taille (pb)	Accession n °	comportement	homologie	Accession no.	Species	BLASTX score/Evalue
Pp1s*	692		↓	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 (EC 6.3.2.19)	AJ002959	<i>Zea mays</i>	259 / 2e-68
Pp2s	585		↓	Early light-induced protein	U82810	<i>Glycine max</i>	157 / 8e-38
Pp3s*	675		↓	Antimicrobial Peptide 1	Y10903	<i>Macadamia integrifolia</i>	113 / 3e-24
Pp4s*	430		↓	40S Ribosomal protein	AL096860	<i>Arabidopsis thaliana</i>	89 / 3e-17
Pp5s	526		↓	RubisCO small chain (EC 4.1.1.39)	CAA38347	<i>Larix laricina</i>	116 / 2e-25
Pp6s	536		↓	cytochrome P450 monooxygenase	T02955	<i>Zea mays</i>	128 / 5e-29
Pp7s	432		↓	hypothetical protein T25B15.70	AL132972	<i>Arabidopsis thaliana</i>	124 / 4e-28
Pp8s	669		↓	Pas d'homologie			
Pp9s	380		↓	Pas d'homologie			
Pp10s	166		↓	Pas d'homologie			
Pp11s	540		↑	DnaJ protein	AAB36543	<i>Phaseolus vulgaris</i>	97 / 2e-19
Pp12s	503		↑	Metallothionein-like protein	U91997	<i>Picea abies</i>	67 / 2e-10
Pp13s	345		↑	hypothetical protein T13M11.8	AC005882	<i>Arabidopsis thaliana</i>	64 / 8e-10

---

orientés. Le projet LIGNOME (génomique fonctionnelle des ligneux) vise justement à poursuivre la description quasi exhaustive de la population des gènes exprimés dans le système racinaire. Dans ce cadre, 10 000 EST seront séquencées pour chaque banque stressée (m3, t3) et non stressée (m0, t3). Des analyses d'expression *in silico* (Claverie, 1999), ainsi que des analyses d'expression utilisant la technique des micro-réseaux, couplées à l'analyse biométrique des données (classification) devraient permettre de décrire l'ensemble des processus cellulaires impliqués dans la réponse au stress hydrique.

### 1.2.2. Etude de la réponse précoce

Afin d'étudier la réponse précoce, au niveau moléculaire, du pin maritime face à un stress hydrique, nous avons réalisé une expérience complémentaire. Cette expérience a consisté à soumettre des plantules non plus à trois semaines de stress (-0,45MPa vs -0,08MPa), comme pour l'ADNc-AFLP, mais à seulement une et cinq heures de stress, les conditions de culture restant inchangées. Les plants de la condition témoin et des deux conditions stressées (une heure et cinq heures) ont été traités en deux lots séparés.

L'analyse des populations de transcrits a été effectuée en utilisant la SSH comme technique de criblage différentielle. Nous avons choisi d'utiliser cette technique car elle présente l'avantage d'analyser l'ensemble du transcriptome en une seule expérience. Après les étapes de soustraction et de suppression, nous avons obtenu deux banques enrichies en messagers spécifiques à chacune des deux conditions analysées. L'exploitation de cette étude est en cours. Sur les 160 clones obtenus (100 pour la banque non stressée et 60 pour la banque stressée) 40 ont été séquencés. 13 correspondent à des clones différents (tableau 5) dont trois proviennent de la banque stressée soustraite à la banque non stressée et neuf de la banque non stressée soustraite à la banque stressée.

L'analyse des séquences nous a permis d'attribuer une fonction à huit des 13 clones séquencés (tableau 5). Les 5 autres séquences correspondent à deux protéines d'*Arabidopsis* et trois nouvelles séquences. A partir du clone Pp7s et de son homologue obtenu par séquençage systématique dans la banque de racine de pin non stressé, nous avons pu reconstituer une séquence consensus qui contient toute la phase de lecture. Ce transcrit code pour une protéine de 163 acides aminés (19,3kD, pI 8,4).

La majeure partie des clones de fonctions connues présente une variation d'expression en accord avec les données de la littérature. Pour les clones isolés dans la banque témoin, nous avons identifié quatre enzymes impliqués dans le métabolisme (Pp1s, Pp4s, Pp5s et Pp6s).

Le clone Pp1s (Ubiquitin conjugaison enzyme E2) correspond à une enzyme qui intervient dans la protéolyse *via* l'ubiquitine (Tongaonkar et al., 2000). La séquence codante de ce clone code pour une protéine de 167 acides aminés. Il a une masse molaire de 18,9kDa et un point isoélectrique de 5,1. Cette enzyme a pour fonction de lier des chaînes polyubiquitinilées aux protéines vouées à la dégradation. Le clone Pp4s code pour une protéine ribosomale 40S. En comparant le fragment que nous avons obtenu avec la banque d'EST de pin maritime, nous avons pu en déterminer la séquence complète de ce gène. La protéine comporte 122 acides aminés. Sa masse molaire est de 13,6kDa et son point isoélectrique de 9,8. Le clone Pp5s correspond à la petite sous-unité de la rubisCO, enzyme impliquée dans l'assimilation carbonée *via* la photosynthèse. Enfin, le clone Pp6s code pour une enzyme de type monooxygénase à cytochrome P450 (Chapple, 1998). Ce type de monooxygénase regroupe une large gamme d'enzymes qui catalysent de nombreux types d'oxydations (ex : hydroxylation, époxidation) sur une large gamme de substrat (ex : vitamines, acides gras). Cependant, nous ne disposons pas de plus amples informations quant à sa spécificité de fonction.

Au niveau de la banque stressée, les deux clones de fonctions connues semblent également intervenir dans la réponse aux stress. Le premier (Pp11s) correspond à une protéine de type DnaJ. Cette protéine intervient dans la formation du complexe Hsp70, qui a une fonction de protéine chaperonne (Diamant et al., 2000). Les protéines de choc thermique de haut poids moléculaire ont été décrites comme étant sur-exprimées au cours de différents stress (Waters et al., 1996). Cette induction chez le pin maritime semble en accord avec les résultats obtenus chez *Salix gilgiana* (Futamura et al., 1999). Les auteurs ont montré une induction du transcrit codant pour cette protéine lors d'un stress salin et d'un stress thermique. De plus, les temps de stress qui ont été utilisés sont proches de ceux que nous avons choisi, à savoir six heures pour la température et vingt-quatre heures pour le stress salin. Le deuxième transcrit (Pp12s) sur-exprimé en condition de stress correspond à une métallothionéine de type 1. Ces protéines appartiennent à une famille qui regroupe différentes classes. La classe correspondant au type 1 a déjà été caractérisée comme étant induite au cours d'un stress hydrique. On pourra par exemple citer les travaux, chez le riz, de Hsieh et Huang (1998) qui ont montré la sur-

---

expression du gène codant pour cette protéine au cours d'un stress hydrique, et caractérisé son promoteur.

Pour deux clones, nous avons observé un comportement opposé aux données disponibles dans la littérature. Le premier (Pp2s) correspond à une protéine ELIP (Early light Induced Protein). Les protéines de type ELIP ont été caractérisées comme étant sur-exprimées au cours du stress lié à la lumière, c'est-à-dire en présence d'une photo-inhibition de la photosynthèse (Adamska et al., 1992). Le même type d'expression a été trouvé pour d'autres types de stress (Bei-Paraskevopoulou et Kloppstech, 1999 - Neale et al., 2000).

Le second (Pp3s) code pour un peptide de 105 acides aminés de masse molaire de 11,6kDa et a un point isoélectrique de 8,9. Il est similaire à une protéine antimicrobienne (AMP1). Cette protéine agit sur la perméabilisation des membranes des bactéries et des levures, en se fixant au niveau des sphingolipides (Thevissen et al., 2000).

Ces protéines ont été décrites chez les angiospermes comme répondant à différents stress. Or ces deux transcrits n'ont jamais été décrits chez les gymnospermes. Il se pourrait que la régulation de leur expression ne réponde pas aux mêmes *stimuli*. La protéine ELIP pourrait jouer le rôle d'une protéine chaperonne en condition normale de croissance. En effet les protéines ELIP ont été décrites comme impliquées dans l'assemblage des photosystèmes. La protéine antimicrobienne pourrait quant à elle avoir une expression basale en condition normale de croissance. Cette expression pouvant être réprimée par des stress abiotiques tels que la sécheresse et/ou induite lors d'attaque de pathogènes. Ce résultat pourrait éventuellement être dû à un problème expérimental (contamination, erreur de manipulation).

Ces résultats préliminaires montrent tout d'abord que la SSH est une technique efficace pour identifier des gènes différentiellement exprimés, même avec une seule étape de soustraction/suppression. Cependant, deux ou trois cycles de soustraction/suppression sembleraient être nécessaires. Toutefois, seules des analyses d'expression nous permettront de déterminer le pourcentage de faux positifs et ainsi d'être plus précis sur le nombre de cycles de soustraction/suppression qu'il est adéquat d'utiliser. Comparés à l'ADNc-AFLP, les fragments obtenus sont en moyenne plus grands, et contiennent les régions 3' terminale. Ce type de fragments présente un intérêt pour la cartographie génétique car ses séquences sont plus variables que les séquences codantes et favorisent donc la recherche de polymorphisme. De plus, les séquences 3'-terminale permettent de discriminer les différents membres d'une

---

même famille multigénique. C'est pourquoi, il semblerait intéressant de poursuivre dans cette voie. Enfin, il est à noter que nous n'avons pas isolé de fragments correspondant à des transcrits faiblement exprimés notamment impliqués dans les phénomènes de transduction du signal et de la transcription. Pour expliquer ces résultats, deux hypothèses peuvent être avancées. La durée d'application du stress était-elle trop longue pour pouvoir observer ces phénomènes ? La technique a-t-elle été bien optimisée quant au nombre de cycles de soustraction/suppression ?

### **1.3. Etude de l'expression au niveau protéique**

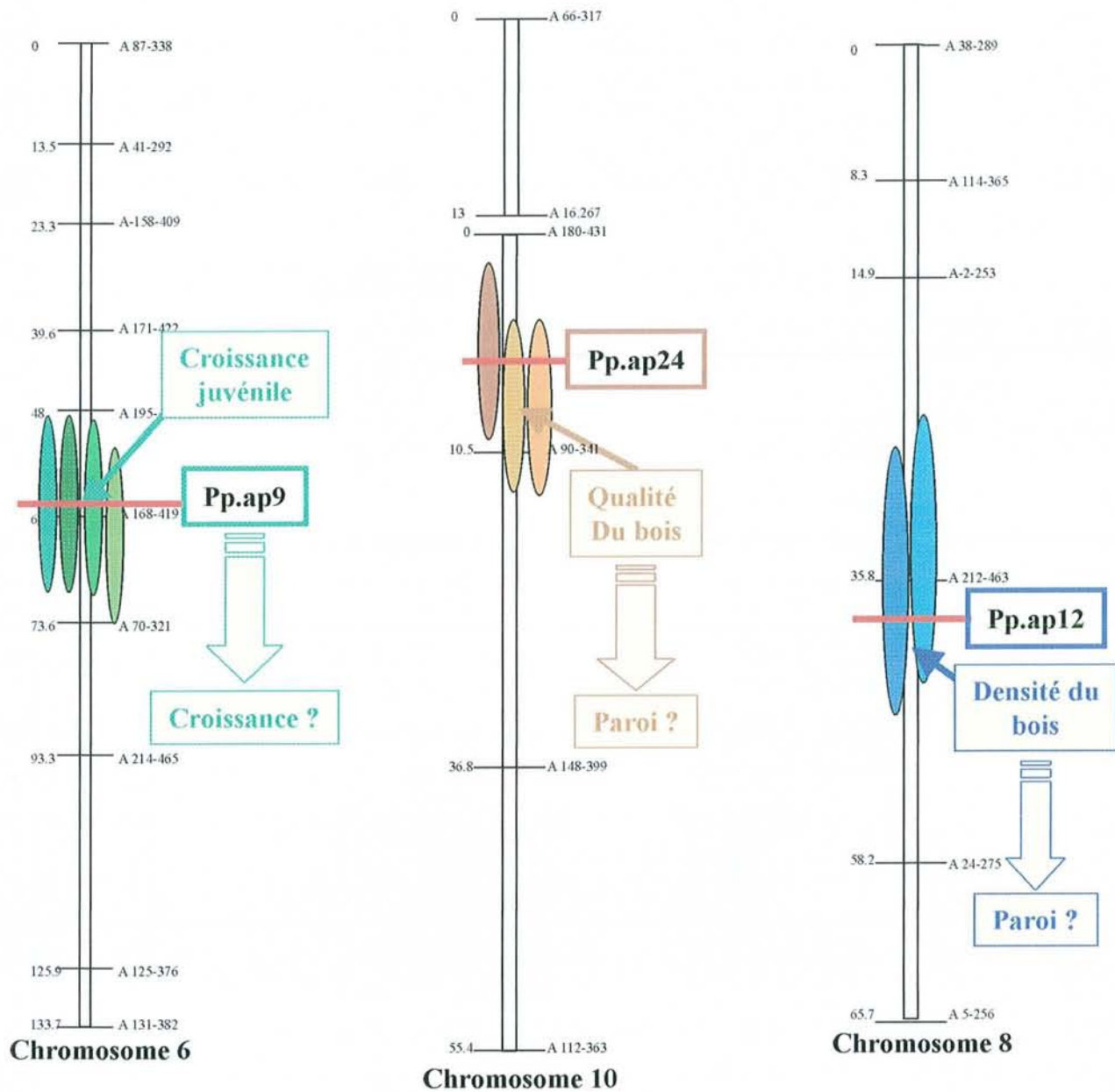
L'ensemble des expériences décrites précédemment pourrait être judicieusement complété par l'étude de la variation de la quantité des protéines, utilisant la technique de l'électrophorèse bidimensionnelle des protéines. Les protéines constituant les outils finaux du fonctionnement cellulaire, il serait intéressant de vérifier qu'il n'y a pas trop de déconnexions entre la quantité des transcrits et des protéines correspondantes. Les nouvelles techniques d'identification des protéines basées sur la spectrométrie de masse (Humphery-Smith et al., 1997) ouvrent ici tout un champ d'investigations pour apporter rapidement des éléments de réponse à cette question.

### **1.4. Etude des métabolites**

Les approches menées au niveau du transcriptome et du protéome pourraient également être complétées par une description plus intégrée de l'évolution qualitative et quantitative des métabolites synthétisés dans les tissus stressés et non stressés. L'étude du métabolome peut s'envisager de manière massive grâce notamment à l'évolution récente des techniques de chimie analytique : spectrométrie de masse, infra rouge, chromatographie (Fiehn et al., 2000 ; voir aussi <http://www.phenomenome.com/metabolicprofiling>).

## **2. Implication des gènes dans la tolérance au stress hydrique**

Il existe deux orientations possibles pour déterminer si les gènes isolés sont impliqués dans la tolérance au stress hydrique ou s'ils correspondent à une réponse simplement induite consécutivement au stress. La première utilise les méthodes de la génétique directe. Elle est basée sur la cartographie des gènes candidats, le positionnement de QTL de caractères



**Figure 44 :** localisation de 3 TDF sur la carte génétique du pin maritime, isolés au niveau des parties aériennes de plants stressés. (○) : Représentation schématique de l'intervalle de confiance pour la localisation de chaque QTL, cartographiés à proximité des TDF.

---

pertinents vis-à-vis du stress et l'étude des colocalisations entre les gènes et les QTL. La seconde utilise les méthodes de la génétique inverse (transformation génétique).

## **2.1. Cartographie des gènes et étude des colocalisations avec des QTL de l'efficacité d'utilisation de l'eau**

Cette étape a été abordée *via* la cartographie des TDF différenciellement exprimés.

Pour cette cartographie, nous avons étudié une descendance en ségrégation de type F1 de 202 pleins-frères appartenant à la troisième génération du programme d'amélioration. Cette famille est issue d'un croisement contrôlé entre deux arbres G1 sélectionnés dans des tests de descendance d'arbres G0. Une carte saturée en marqueurs AFLP a été construite à partir de l'ADN génomique extrait pour chacun des 202 arbres (Chagne, 2000).

Afin de cartographier nos EST, nous avons utilisé la technique de SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism, Orita et al., 1989). Cette technique est basée sur le comportement électrophorétique d'un fragment d'ADN simple brin dans un gel d'acrylamide non dénaturant. En effet, une molécule d'acide nucléique monocaténaire peut former des structures secondaires dues à des appariements de bases au sein de la molécule. Ces structures secondaires dépendent de la séquence propre du brin d'ADN et donnent une conformation particulière à chaque type de molécule monocaténaire. Nous avons donc défini des amorces pour la majeure partie de nos EST, et amplifié la séquence correspondante sur l'ADN génomique de chacun des individus. Ainsi il est possible, après séparation sur gel, d'observer le comportement électrophorétique de chacun des allèles, et de déterminer la manière dont ils ségrégent. Actuellement, 3 TDF de fonction inconnue (Pp.ap9, Pp.ap12 et Pp.ap24) isolés sur les parties aériennes ont déjà été cartographiés par SSCP sur 3 groupes de liaisons différents : le 6, le 8 et le 10 de la carte génétique du pin maritime (figure 44).

Des QTL de l'efficacité d'utilisation de l'eau (le paramètre physiologique utilisé pour discriminer les arbres tolérants à la sécheresse) ont été récemment placés sur cette carte (Brendel et al., 2001). Nous n'avons observé aucune colocalisation entre nos gènes et les QTL de stress hydrique. Cependant, des QTL de qualité du bois et de croissance ont aussi été cartographiés (Thèse de David Pot, en cours), à proximité desquels ces trois gènes ont été localisés. Pp.ap9 a été localisé à proximité d'un QTL impliqué dans la croissance juvénile,

---

Pp.ap12 d'un QTL impliqué dans la densité du bois et Pp.ap24 d'un QTL impliqué dans la qualité du bois (figure 42). Si ces colocalisations ne sont pas dues au hasard, ces résultats pourraient indiquer que la fonction des TDF isolés serait liée à la diminution de la croissance et aux modifications pariétales (voie particulière de la réponse au stress hydrique).

## **2.2. Mise en place d'une nouvelle expérience**

### **2.2.1. Choix d'une famille en ségrégation**

Par rapport à la famille de plein-frères Landais utilisée, des descendances F2 d'hybrides interraciaux auraient l'avantage de présenter des caractéristiques plus contrastées. De tels croisements [Landes (France) x Tamjout (Maroc)] peuvent être facilement produits.

Lors de la germination des semences, les mégagamétophytes pourraient être récoltés pour réaliser la cartographie de l'hybride comme l'ont décrit Plomion et al. (1995).

### **2.2.2. Choix des conditions de cultures**

A partir des plantules ainsi obtenues, il serait possible de réaliser des expériences en hydroponie, en se focalisant sur les deux conditions bien contrastées que nous avons utilisées pour l'application de l'ADNc-AFLP (-0,45MPa et -0,08MPa, après 21 jours de stress).

### **2.2.3. Choix des caractères pour la recherche de QTL**

#### **2.2.3.1. Détection de TQL (Transcript Quantity Loci)**

La première méthode permettant de quantifier l'accumulation des transcrits consiste à réaliser des RT-PCR, en utilisant comme matrice l'ADNc synthétisé à partir des ARN totaux de chacun des plants, et un couple d'amorces pour chaque EST que l'on désire quantifier. Cette option reste cependant difficile à mettre en œuvre (définition des amorces, optimisation des PCR, etc.) et relativement coûteuse pour être utilisée dans le cadre d'une approche massive.

La deuxième option est basée sur l'utilisation de filtres à ADNc (ou « arrays ») contenant tous les EST différenciellement exprimés que nous avons isolés, voire plusieurs milliers d'EST



---

issus du séquençage systématique. Ces filtres pourraient être hybridés avec les sondes réalisées à partir des individus stressés ou non. Comme la synthèse des sondes nécessite très peu de matériel, il serait possible d'effectuer les prélèvements de façon non destructive, ce qui permettrait de conserver les individus pour d'autres types d'analyses. Ainsi il sera possible de relier des variations de quantité de transcrits aux marqueurs moléculaires de la carte. Ce type d'approche a été réalisé avec succès pour la localisation de QTL d'activités enzymatiques (QTL ; Causse et al., 1995) et de quantités de protéines (PQL ; Damerval et al., 1994).

### **2.2.3.2. Détection de QTL pour des paramètres physiologiques**

Les mesures de variables physiologiques telles que l'efficacité d'utilisation de l'eau (discrimination isotopique du carbone), le potentiel osmotique, la croissance des parties aériennes et racinaires, le taux de photosynthèse et la conductance stomatique pourraient être réalisés sur ces mêmes plants. Ceci permettrait, en parallèle à la recherche de TQL, de rechercher des QTL pour des paramètres physiologiques liés au stress hydrique.

### **2.2.3.3. Détection de PQL (Protein Quantity Loci)**

Enfin, l'extraction des protéiques se faisant à partir de très faibles quantités de matériel végétal (Bahrman et al., 1997), il serait possible de réaliser des extractions protéiques à partir des aiguilles et des racines pour chacun des individus, stressés ou non avant et après le stress. Les protéines pourraient alors être révélées par électrophorèse bidimensionnelle pour chacun des individus, puis quantifiées. Ce type d'expérience associé à la construction de la carte génétique pourrait permettre de détecter des PQL, particulièrement pour les protéines impliquées dans la réponse au stress hydrique, comme l'a montré Paulo Costa au cours de sa thèse (1999).

En travaillant sur une même famille en ségrégation, il serait alors possible d'identifier les gènes réellement impliqués dans la tolérance au stress en étudiant les colocalisations entre gènes, TQL, PQL et QTL.

## **3. Apport de la génétique inverse pour déterminer la fonction des EST**

---

La transformation génétique peut aussi permettre de prouver l'implication des gènes candidats « expressionnels » ou « positionnels ».

La transformation génétique de plantes peut permettre la sur-expression ou la sous-expression (par co-suppression ou construction antisens). Bien que cette technique soit difficile à mettre en œuvre (transformation, régénération, site d'insertion du transgène, encombrement en serre) elle offre l'avantage d'étudier directement chez les plantes l'effet d'un gène particulier lors d'un stress hydrique (Sivamani et al., 2000 – Pustovoitova et al., 2000). Cependant, bien que la transformation soit possible et la régénération de plants de pin maritime à partir d'embryons somatique soit disponible (Lelu et al., 1999), il reste préférable de fonctionner en système hétérologue, c'est-à-dire de transférer les gènes du pin maritime dans une autre plante tel que le peuplier, le tabac ou *Arabidopsis*. Un autre aspect important est le choix du promoteur. Il serait intéressant pour les études liées au stress hydrique chez le pin maritime de choisir des promoteurs spécifiquement inductibles par ce type de stress. On pourrait par exemple, à partir du clone Pp.ap11 qui code pour une protéine PR-10, dont le transcrit est spécifiquement induit lors du stress hydrique (Dubos et Plomion., 2001 : publication3), isoler le promoteur correspondant et l'inclure dans la construction des vecteurs. Un autre promoteur pourrait être celui du clone Pp.ap14 qui code pour une protéine de type noduline, dont l'expression a seulement été observée en condition de stress hydrique. En effet, ce type de vecteur permet d'avoir une expression due seulement à l'application du stress. Il serait aussi possible d'utiliser des promoteurs dont l'activité est spécifique du tissu. Nous pourrions utiliser celui du clone Pp.ap4, codant pour une phosphatase acide, qui n'est exprimé que dans les aiguilles de plants stressés. De la même manière, celui du clone Pp.ap2 (codant pour une protéine hypothétique) apparaît comme étant spécifique des tiges et des racines non stressées (publication 2).

La complémentation de mutant de levure constitue une autre possibilité. Les mutants sensibles au stress hydrique sont couramment utilisés pour ce type de travaux. Il s'agit dans ce cas de transférer la séquence complète de l'ADNc correspondant au gène candidat que l'on a préalablement isolé. Cette méthode est extrêmement souple comparée à la complémentation de mutant provenant de végétaux. En effet, les levures sont des eucaryotes unicellulaires qui sont très facilement manipulables et qui ne posent pas de problème d'encombrement spatial. De plus, les modifications post-traductionnelles et post-transcriptionnelles sont très proches

---

de celles que l'on peut observer chez les plantes, comparées aux modifications procaryotiques. Plusieurs travaux ont déjà montré l'efficacité de cette technique notamment en transformant des levures (*Saccharomyces*) sensibles au stress hydrique avec des ADNc provenant d'*Arabidopsis*, du riz, du tabac ou bien encore de *M. crystallinum* (Ichimura et al., 1998 – Lee et al., 1999).

Enfin, différentes banques de mutants d'*Arabidopsis* ont été obtenues par insertion de « T-DNA » Il est alors possible de rechercher les mutants dont les gènes mutés correspondent aux EST différentiellement exprimés chez le pin maritime. Ce type de système permettra d'apporter des informations non négligeables sur la fonction des EST de pin maritime, en étudiant les mécanismes impliqués chez *Arabidopsis*. *Arabidopsis* reste donc un système de choix pour étudier les gènes isolés chez le pin maritime où la création de banque de mutants apparaît difficilement réalisable.

## **BIBLIOGRAPHIE**

## A

- Alamillo JM, Bartels D** (1996) Light and stage of development influence the expression of desiccation-induced genes in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Plant Cell Env* **19**: 300-310
- Alia HH, Chen THH, Murata N** (1998) Transformation with a gene for choline oxidase enhances the cold tolerance of Arabidopsis during germination and early growth. *Plant Cell Envir* **21**: 232-239
- Allona I, Quinn M, Shoop E, Swope K, St Cyr S, Carlis J, Riedl J, Reyzel E, Campbell MM, Sederoff R, Whetten RW** (1998) Analysis of xylem formation in pine by cDNA sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 9693-9698
- Altschul SF, Stephen F, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W., Lipman DJ** (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**: 3389-3402
- Anderson N, Anderson N** (1998) Proteome and proteomics: New technology, new concepts, and new words. *Electrophoresis* **19**:1853-1861
- Annamalai P, Yanagihara S,** (1999) Identification and characterization of a heat-stress induced gene in cabbage encodes a Kunitz type protease inhibitor. *J Plant Physiol* **155**: 226-233
- Arnon DI** (1949) copper enzymes in isolated chloroplasts, polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol* **24**: 1-15
- Asamizu E, Nakamura Y, Sato S, Fukuzawa H, Tabata S** (1999) A large scale structural analysis of cDNAs in a unicellular green alga, *Chlamydomonas reinhardtii*. I. Generation of 3433 non-redundant expressed sequence tags. *DNA Research* **6**: 369-373
- Asamizu E, Nakamura Y, Sato S, Fukuzawa H, Tabata S** (2000) A large scale structural analysis of cDNAs in Arabidopsis thaliana: Generation of 12,028 non-redundant expressed sequence tags from normalized and size-selected cDNA libraries. *DNA Research* **7**: 175-180
- Audic S, Claverie J-M** (1997) The significance of digital gene expression profile. *Genome Research* **7**: 986-995

## B

- Bachem CW, Oomen RJF, Kuyt S, Horvath BM, Claassens MM, Vreugdenhil D, Visser RG** (2000) Antisense suppression of a potato alpha-SNAP homologue leads to alterations in cellular development and assimilate distribution. *Plant Mol Biol* **43**: 473-482
- Bachem CWB, Oomen RJ, Visser RGF** (1998) Transcript imaging with cDNA-AFLP: A step-by-step protocol. *Plant Mol Biol Rep* **16**: 157-173
- Bachem CWB, Van der Hoeven RS, de Bruijn SM, Vreugdenhil D, Zabeau M, Visser RGF** (1996) Visualisation of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: Analysis of gene expression during potato tuber development. *Plant J* **9**: 745-753.
- Bahrman N, Damerval C, Zivy M** (1996) Two-dimensional electrophoresis of proteins as a source of monogenic and codominant markers for population genetics and mapping the expressed genome. *Heredity* **76**:166-177
- Bahrman N, Plomion C, Petit RJ, Kremer A** (1997) Contribution of two-dimensional electrophoresis of proteins to maritime pine genetics. *Ann Sci For* **54**: 225-236
- Bahrman N, Plomion C, Petit RJ, Kremer A** (1997) Contribution of two-dimensional electrophoresis of proteins to maritime pine genetics. *Ann Sci For* **54**: 225-236

- Bajaj S, Targolli J, Liu L-F, Ho T-HD, Wu R** (1999) Transgenic approaches to increase dehydration-stress tolerance in plants. *Mol Breeding* **5**: 493-503
- Baker J, Steele C, Dure L III** (1988) Sequence and characterization of 6 *lea* proteins and their genes from cotton. *Plant Mol Biol* **11**: 277-291
- Baradat PH, Marpeaux-Bezard A** (1988) Le pin maritime, *Pinus pinaster* Ait.. Biologie et génétique des terpènes pour la croissance et l'amélioration de l'espèce. PhD Thesis, Université Bordeaux I, France
- Barral Y, Jentsch S, Mann C** (1995) G1 cyclin turnover and nutrient uptake are controlled by a common pathway in yeast. *Gene Dev* **9**: 399-409
- Barrieu F, Marty-Mazars D, Thomas D, Chaumont F, Charobonnier M, Marty F** (1999) Desiccation and osmotic stress increase the abundance of m RNA of the tonoplast aquaporin BobTIP26-1 in cauliflower cells. *Planta* **209**: 77-86
- Bartels D, Hanke C, Schneider K, Michel D, Salami F** (1992) A desiccation-related Elip-like gene from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* is regulated by light and ABA. *EMBO J* **11**: 2771-2778
- Bartholomew DM, Bartley GE, Scolnik PA** (1991) Abscisic acid control of *rbcS* and *cab* transcription in tomato leaves. *Plant Physiol* **96**: 291-296
- Bassam BJ, Caetano-Anolles G, Gresshoff PM** (1991) Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* **196**: 80-83
- Bauer, D. Biehler, K. Fock, H. Carrayol, E. Hirel, B. Migge, A. Becker, T. W** (1997) A role for cytosolic glutamine synthetase in the remobilization of leaf nitrogen during water stress in tomato. *Physiologia Plantarum* **99**: 241-248
- Belknap WR, Garbarino JE** (1996) The role of ubiquitin in plant senescence and stress responses. *Trends Plant Sci* **1**: 331-335
- Bertioli DJ, Schlichter UHA, Adams MJ, Burrows PR, SteinbißH-H, Antoniw JF** (1995) An analysis of differential display shows a strong bias towards high copy number mRNAs. *Nucleic Acids Res* **23**: 4520-4523
- Bianchi G, Gamba A, Murelli C, Salamini F, Bartels D** (1991) Novel carbohydrate metabolism in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Plant J* **1**: 355-359
- Bilgin M, Dedeoglu D, Omirulleh S, Peres A, Engler G, Inzé D, Dudits D, Fehér A** (1999) Meristem, cell division and S phase-dependent activity of wheat histone H4 promoter in transgenic maize plants. *Plant Sci* **143**: 35-44
- Birch PRJ, Avrova AO, Duncan JM, Lyon GD, Toth RL** (1999) Isolation of potato genes that are induced during an early stage of the hypersensitive response to *Phytophthora infestans*. *Mol Plant-Microbe Interactions* **12**: 356-361
- Birch PRJ, Toth IK, Avrova AO, Dellagi A, Lyon GD, Pillay D** (2000) Recent advances in the identification of differentially expressed genes. *South African J Science* **96**: 83-85
- Bjellqvist B, Ek K, Richetti P, Gorg A, Westemair R, Postel W** (1982) Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications. *J Biochem Biophysiol Methods* **6**: 317-339
- Blattner FR, Plunkett G, Bloch CA, Perna NT, Burland V, Riley M, Collado-Vides J, Glasner JD, Rode CK, Mayhew GF, Gregor J, Davis NW, Kirkpatrick HA, Goeden MA, Rose DJ, Mau B, Shao Y** (1997) The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277**: 1453-1474
- Blomstedt CK, Gianello RD, Gaff DF, Hamill JD, Neale AD** (1998) Differential gene expression in desiccation-tolerant and desiccation-sensitive tissue of the resurrection grass, *Sporobolus stapfianus*. *Australian J Plant Physiol* **25**: 937-946
- Bork P, Koonin EV** (1998) Predicting functions from protein sequences: where are the bottlenecks?. *Nat Genet* **18**: 313-318

- Borkird C, Simoens C, Villarroel R, van Montagu M** (1991) Gene expression associated with water-stress adaptation of rice cells and identification of two genes as hsp70 and ubiquitin. *Physiologia Plantarum* **82**: 449-457
- Bouchez D, Höfte H** (1998) Functional genomics in plants. *Plant Physiol* **118**: 725-732
- Bournay AS, Hedley PE, Maddison A, Waugh R, Machray GC** (1996) Exon skipping induced by cold stress in a potato invertase gene transcript. *Nucleic Acids Res.* **24**: 2347-2351
- Bouvarel P** (1960) Note sur la résistance au froid de quelques provenances de pin maritime. *Rev For Fr* **7**:495-508
- Braam J, Sistrunk ML, Polisensky DH, Xu W, Purugganan MM, Antosiewicz DM, Campbell P, Johnson KA** (1997) Plant responses to environmental stress: regulation and functions of the Arabidopsis TCH genes. *Planta* **203**: 35-41
- Bray EA, Shih TY, Moses MS, Cohen A, Imai R, Plant AL** (1999) Water-deficit induction of a tomato H1 requires abscisic acid. *Plant Growth Regulation* **29**: 35-46
- Brendel O, Pot D, Rozenberg P, Plomion C, Guehl JM** (2001) Genetic determinism of carbon isotop discrimination in maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.). Soumis.
- Burstin J, Zivy M, de Vienne D, Damerval C** (1993) Analysis of scaling methods to minimize experimental variations in two-dimensional electrophoresis quantitative data: Application to the comparaison of maize inbred lines. *Electrophoresis* **14**: 1067-1073

## C

- Cairney J, Pullman GS, Xu N, Ciavatta VT, Johns B** (1997) A tool to follow natural and somatic embryo development in loblolly pine. TAPPI Biological Symposium, (ISBN 0-89852-695-7) San Francisco Mariott, San Francisco CA. pp 85-91
- Cairney J, Newton RJ, Funkhouser EA, Chang S, Hayes D** (1995) Nucleotide sequence of a cDNA for water channel protein (aquaporin) homolog from *Atriplex canescens* (Pursh.) Nutt. *Plant Physiol* **108**: 1291-1292
- Cairney J, Xu N, Pullman GS, Ciavatta VT, Johns B** (1999) Natural embryo development in loblolly pine. *Applied Biochem Biotech* **77-79**: 5-17
- Capell T, Escobar C, Liu H, Burtin D, Lepri O, Christou P** (1998) Overexpression of the oat arginine decarboxylase cDNA in transgenic rice (*Oryza sativa* L.) affects normal development patterns in vitro and results in putrescine accumulation in transgenic plants. *Theor Appl Genet* **97**: 246-254
- Carpenter JF, Crowe LM, Crowe JH** (1987) Stabilization of phosphofructokinase with sugars during freeze-drying: characterization of enhanced protection in the presence of divalent cations. *Biochim Biophys Acta* **923**: 109-115
- Chagne D** (2000) Cartographie génétique comparée chez les conifères. Etudes menées chez le pin maritime (*Pinus pinaster* Ait) et l'Epicéa commun (*Picea abies* L. Karst.). DEA, Université Henri Poincaré Nancy I, France
- Chambers G, Lawrie L, Cash P, Murray G** (2000) Proteomics: a new approach to the study of disease. *J. Pathol.* **192**:280-288
- Chang S, Puryear J, Cairney J** (1993) A simple and efficient method for Isolating RNA from pine trees. *Plant Mol Biol Rep* **11**: 113-116
- Chang, S., Puryear, JD., Dias MADL, funkhouser EA, Newton RJ, Cairney, J** (1995) Gene expression under water deficit in loblolly pine (*Pinus taeda* L.): isolation and characterization of cDNA clones. *Physiologia Plantarum* **97**:139-148
- Chapman DJ, Barber DJ** (1987) Polar lipids of chloroplast membranes. *Methods in Enzymology* **148**: 294-319

- Chapple C** (1998) Molecular-genetic analysis of plant cytochrome P450-dependant monooxygenases. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **49**: 311-343
- Chaudhary S, Crossland L** (1996) Identification of tissue-specific, dehydration-responsive elements in the Trg-31 promoter. *Plant Mol Biol* **30**: 1247-1257
- Chowdhury S, Smith KW, Gustin MC** (1992) Osmotic stress and the yeast cytoskeleton: phenotype-specific suppression of an actin mutation. *J Cell Biol* **118**: 561-571
- Chrast R, Scott HS, Papasawas MP, Rossier C, Antonarakis ES, Barras C, Davisson MT, Schmidt C, Estivill X, Dierssen M, Pritchard M, Antonarakis SE** (2000) The mouse brain transcriptome by SAGE: differences in gene expression between P30 brains of partial trisomy 16 mouse model of down syndrome (Ts65Dn) and normal. *Genome Research* **10**: 2006-2021
- Chumakov IM, Rigault P, Le Gall I, Bellanne-Chantelot A, Billault A, Guillou S, Soularue S, Guasconi G, Poullier E, Gros I et al** (1995) A YAC contig map of the human genome. *Nature* **377**: 175-297
- Claverie J-M** (1999) Computational methods for the identification of differential and coordinated gene expression. *Human Mol Genetics* **8**: 1821-1832
- Cohen A, Bray EA** (1990) Characterization of three mRNAs that accumulate in wilted tomato leaves in response to elevated levels of endogenous abscisic acid. *Planta* **182**: 27-33
- Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, Gordon SV, Eiglmeier K, Gas S, Barry CE, Tekaiia F, Badcock K, Basham D, Brown D, Chillingworth T, Connor R, Davies R, Devlin K, Feltwell T, Gentles S, Hamlin N, Holroyd S, Hornsby T, Jagels K, Barrell BG, et al.** (1998) Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* **393**: 537-544
- Colmenero-Flores JM, Campos F, Garcarrubio A, Covarrubias AA** (1997) Characterization of *Phaseolus vulgaris* cDNA clones responsive to water deficit: identification of a novel late embryogenesis abundant-like protein. *Plant Mol Biol* **35**: 393-405
- Cossins EA** (1980) One-carbon metabolism. In DD Davies, eds, *The biogeochemistry of plants*, Vol II. Academic Press, NY, 365-378
- Costa P** (1999) Réponse moléculaire, physiologique et génétique du pin maritime à une contrainte hydrique. PhD thesis, Université Henri Poincaré Nancy I, France
- Costa P, Bahrman N, Frigerio J-M, Kremer A, Plomion C** (1998) Water-deficit-responsive proteins in maritime pine. *Plant Mol Biol* **38**: 587-596
- Costa P, Pionneau C, Bauw G, Dubos C, Bahrman N, Kremer A, Frigerio J-M, Plomion C** (1999) Separation and characterization of needle and xylem maritime pine proteins. *Electrophoresis* **20**: 1098-1108
- Costa P, Plomion C** (1998) Genetic analysis of needle proteins in maritime pine. *Silvae Genetica* **48**: 146-150
- Creelman RA, Mullet JE** (1991) Water deficit modulates gene expression in growing zones of soybean seedlings. Analysis of differentially expressed cDNAs, a new  $\beta$ -tubulin gene, and expression of genes encoding cell wall proteins. *Plant Mol Biol* **17**: 591-608
- Cribiu EP, Schibler L** (2000) Introduction à la cartographie des génomes complexes. *Production Animales*, Vol Hors série: Génétique moléculaire : principes et application aux populations animales. INRA (eds), Versailles, France, 69-72
- Croston G, Kerrigan LA, Lira LM, Marshak DR, Kadonaga JT** (1991) Sequence-specific antirepression of histone H1-mediated inhibition of basal RNA polymerase II transcription. *Science* **251**: 643-649
- Crowe JH, Crowe LM, Jackson SA** (1983b) Preservation of structural and functional activity in lyophilized sarcoplasmic reticulum. *Arch Biochem Biophys* **220**: 477-484



- Crowe JH, Hoekstra FA, Crowe LM** (1992a) Anhydrobiosis. *Annal Rev physiol* **54**: 579-599
- Cushman JC, Meyer G, Michalowski CB, Schmitt JM, Bohnert HJ** (1989) Salt stress leads to differential expression of two isogenes of phosphoenolpyruvate carboxylase during crassulacean acid metabolism induction in the common ice plant. *Plant Cell* **1**: 715-725
- Cushman JC, Bohnert H** (2000) Genomic approaches to plant stress tolerance. *Cur Opin Plant Biol* **3**: 117-124

## D

- Damerval C, Maurice A, Josse JM, de Vienne D** (1994) Quantitative trait loci underlying gene product variation: a novel perspective for analyzing regulation of genome expression. *Genetics* **137**: 289-301
- Danjon F** (1994) Stand features and height growth in a 36-year-old maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.) provenances test. *Silvae Genetica* **43**: 52-62
- de Vienne D, Burstin J, Gerber S, Leonardi A, Le Guilloux M, Murigneux A, Beckert M, Bahrman N, Damerval C, Zivy M** (1996) Two-dimensional electrophoresis of proteins as a source of monogenic and codominant markers for population genetics and mapping the expressed genome. *Heredity* **46**: 166-177
- de Vienne D, Léonardi A, Damerval C, Zivy M** (1999) Genetics of proteome variation for QTL characterization: application to drought-stress response in maize. *J Exp Bot* **50**:303-309
- Deepika M, Anil G** (1999) Transcript levels of genes encoding various glycolytic and fermentation enzymes change in response to abiotic stresses. *Plant Sci* **146**: 41-51.
- Déjardin A, Sokolov LN, Kleczkowski LA** (1999) Sugar/osmoticum levels modulate differential abscisic acid-independent expression of two stress-responsive sucrose synthase genes in *Arabidopsis*. *Biochem J* **344**: 503-509
- Deleu C, Coustaut M, Niogret MF, Larher F** (1999) Three new osmotic stress-regulated cDNAs identified by differential display polymerase chain reaction in rapeseed leaf discs. *Plant Cell Env* **22**: 979-988
- Dellagi A, Birch PRJ, Heilbronn J, Lyon GD, Toth IK** (2000) cDNA-AFLP analysis of differential gene expression in the prokaryotic plant pathogen *Erwinia carotovora*. *Microbiology* **146**: 165-171
- Demeulemeester MAC, de Proft MP** (2000) Molecular biological study of stem formation on chicory root explants in vitro. *Acta Horticulturae* **520**: 239-247
- DeRisi JL, Iyer VR, Brown PO** (1997) Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science* **278**: 680-685
- Desprez T, Amselem J, Caboche M, Höfte H** (1998) Differential gene expression in *Arabidopsis* monitored using cDNA arrays. *Plant J* **14**: 643-652.
- Desprez-Lousteau M-L, Dupuis F** (1994) Variation in the phenology of shoot elongation between geographic provenances of maritime pine (*Pinus pinaster*) – Implications for the synchrony with the phenology of the twisting rust *Melampsora pinitorqua*. *Ann Sci for* **51**: 553-568
- Deleu C, Coustaut M, Niogret MF, Larher F** (1999) Three new osmotic stress-regulated cDNAs identified by differential display polymerase chain reaction in rapeseed leaf discs. *Plant Cell Env* **22**: 979-988
- Diamant S, Ben-Zvi AP, Bukau B, Goloubinoff P** (2000) Size-dependent disaggregation of stable protein aggregates by the DnaK chaperone machinery. *J Biol Chem.* **275**: 21107-21113

- Diatchenko LD, Lau Y, Campbell AP, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, Lukyanov S, Gurskaya N, Sverdlov ED, Siebert PD** (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
- Dixon R, Paiva NL** (1995) Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *The plant cell* **7**: 1085-1097.
- Downing WL, Mauxion F, Fauvarque M-O, Reviron M-P, de Vienne D, et al** (1992) A *Brassica napus* transcript encoding a protein related to the Kunitz protease inhibitor family accumulates upon xater stress in leaves, not in seeds. *Plant J* **2**: 685-693
- Dubos C, Plomion C** (2001) Drought differentially affects expression of a PR-10 protein, in needles of maritime pine (*Pinus pinaster* Ait) seedlings. *J Exp Bot In press*
- Dure L, Crouch M, Harada J, Ho T-HD, Mundy J, Quatrano R, Thomas T, Sung R** (1989) Common amino acid sequence domains among the LEA proteins of higher plants. *Plant Mol Biol* **12**: 475-486
- Durrant WE, Rowland O, Piedras P, Hammond-Kosack KE, Jones JDG** (2000) cDNA-AFLp reveals a striking overlap in race-specific resistance and wound response gene expression profiles. *Plant Cell* **12**: 963-977
- Dutt M. and Lee K** (2000) Proteome analysis. *Curr. Opin. Biotechnol.* **11**:176-179

## E

- Eisen MB, Spellman PT, Brown OO, Botstein D** (1998) Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 14863-14868
- El-Meanawy MA, Schelling JR, Pozuelo F, Churpek MM, Ficker E, Iyengar S, Sedor JR** (2000) Use of serial analysis of gene expression to generate kidney expression libraries. *American J Physiol* **279**: 383-392
- Erdmann VA, Szymanski M, Hochberg A, de Groot N, Barciszewski J** (1999) Collection of mRNA-like non-coding RNAs. *Nucleic Acids Research* **27**: 192-195
- Eshdat Y, Holland D, Faltin Z, Ben-Hayyim G** (1997) Plant glutathione peroxidases. *Physiologia plantarum* **100**: 234-240
- Espelund M, De Debout JA, Outlaw WH, Jakobsen KS** (1995) Environmental and hormonal regulation of barley late-embryogenesis-abundant (Lea) mRNAs is via different signal transduction pathways. *Plant Cell Env* **18**: 943-949
- Espinosa-Ruiz A, Belles JM, Serrano R, Cullianez-Macia FA** (1999) *Arabidopsis thaliana* AtHAL3: a flavoprotein related to salt and osmotic tolerance and plant growth. *Plant J* **20**: 529-539
- Ewing RM, Kahla AB, Poirot O, Lopez F, Audic S, Claverie J-M** (1999) Large-scale analyses of rice ESTs reveal correlated patterns of gene expression. *Genome Research* **9**: 950-959

## F

- Farjon A** (1984) Pines. Drawings and descriptions of the genus pinus. Ed brill EJ, Backhuys W, Leiden, NL,220p
- Farquhar GD, Ehleringer JR, Hubick KT** (1989) Carbon isotope discrimination and photosynthesis. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **40**: 503-537
- Fiehn O, Kopka J, Dörmann P, Altmann T, Trethewey RN, Willmitzer L** (2000) Metabolite profiling for plant functional genomics. *Nature Biotech* **18**: 1157-1161

- Fieldes MA, Gerhardt KE** (1998) Apparent differences in the posttranslational modification of peroxidase between flax genotrophs and genotypes and between normal and stress-induced isozymes. *International J Plant Sci.* **159**: 504-512
- Fleischmann RD, Adams MD, White O, Clayton RA, Kirkness EF, Kerlavage AR, Bult CJ, Tomb JF, Dougherty BA, Merrick JM, et al.** (1995) Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* **269**: 496-512
- Fodor SPA** (1997) Massively parallel genomics. *Science* **277**: 393-395
- Folch J, Lees M, Stanley GHS** (1957) *J. Biol. Chem* **226**: 497-509
- Forster BP, Ellis RP, Thomas WTB, Newton AC, Tuberosa R, This D, El-Enein RA, Bahri MH, Ben Salem M** (2000) The development and application of molecular markers for abiotic stress tolerance in barley. *J Exp Bot* **51**: 19-27
- Forsthoefel NR, Cushman MAF, Ostrem JA, Cushman JC** (1998) Induction of cystein protease cDNA from *Mesembryanthemum crystallinum* leaves by environmental stress and plant growth regulators. *Plant Sci* **136**: 195-206
- Foyer CH, Valadier MH, Migge A, Becker TW** (1998) Drought-induced effects on nitrate reductase activity and mRNA and on the coordination of nitrogen and carbon metabolism in maize leaves. *Plant Physiol* **117**: 283-292
- Fraser CM, Casjens S, Huang WM, Sutton GG, Clayton R, Lathigra R, White O, Ketchum KA, Dodson R, Hickey EK, Gwinn M, Dougherty B, Tomb JF, Fleischmann RD, Richardson D, Peterson J, Kerlavage AR, Quackenbush J, Salzberg S, Hanson M, van Vugt R, Palmer N, Adams MD, Gocayne J, Venter JC, et al.** (1997) Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. *Nature* **390**: 580-586
- Fraser CM, Norris SJ, Weinstock GM, White O, Sutton GG, Dodson R, Gwinn M, Hickey EK, Clayton R, Ketchum KA, Sodergren E, Hardham JM, McLeod MP, Salzberg S, Peterson J, Khalak H, Richardson D, Howell JK, Chidambaram M, Utterback T, McDonald L, Artiach P, Bowman C, Cotton MD, Venter JC, et al.** (1998) Complete genome sequence of *Treponema pallidum*, the syphilis spirochete. *Science* **281**: 375-88
- Fridlyand LE, Kaler VL** (1987) Possible CO<sub>2</sub> concentrating mechanism in chloroplast of C3 plants. Role of carbonic anhydrase. *Gen Physiol Biophys* **6**: 617-636
- Fujii N, Akino S, Nishimura R, Ogoshi A** (1999) Specifically isolated cDNA using cDNA-RDA from A2 mating type isolates of *Phytophthora infestans*. *J Faculty Agri Hokkaido Univ* **69**: 171-179
- Fukuda T, Kido A, Kajino K, Tsutsumi M, Miyauchi Y, Tsujiuchi T, Konishi Y, Hino O** (1999) Cloning of differentially expressed genes in highly and low metastatic rat osteosarcomas by a modified cDNA-AFLP method. *Biochem Biophys Research communications* **261**: 35-40
- Futamura N, Ishii-Minami N, Hayashida N, Shinohara K** (1999) Expression of DnaJ homologs and Hsp70 in the Japanese willow (*Salix gigliana* Seemen). *Plant Cell Physiol* **40**: 524-531

## G

- Gallie DR** (1993) Posttranscriptional regulation of gene expression in plants. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **44**: 77-105
- Garcia AB, de Almeida Engler J, Iyer S, Gerats T, van Montagu M, Caplan AB** (1997) Effects of osmoprotectants upon NaCl stress in rice. *Plant Physiol* **115**: 159-169

- Garray-Arroyo A, Colmenero-Flores JM, Garcarrubio A, Covarrubias AA** (2000) Highly hydrophilic proteins in prokaryotes and eukaryotes are common during conditions of water deficit. *J Biological Chem* **275**: 5668-5674
- Garrels JI, Futcher B, Kobayashi R, Latter GI, Schwender B, Volpe T, Warner JR, McLaughlin CV** (1994) Protein identifications for *Saccharomyces cerevisiae* protein database. *Electrophoresis* **15**: 1466-1486
- Gear AJ, Huntley B** (1990) Rapid changes in the range limits of Scots pine 4000 years ago. *Science* **251**: 544-547
- Geng M, Wallrapp C, Müller-Pillasch F, Frohme M, Hoheisel JD, Gress TM** (1998) Isolation of differentially expressed genes by combining representational difference analysis (RDA) and cDNA library arrays. *BioTechniques* **25**: 434-438
- Gerhold D, Caskey CT** (1996) It's the genes! EST access to human genome content. *Bioassays* **18**: 973-981
- Gerhold D, Rushmore T, Caskey C** (1999) DNA chips:promising toys have become powerful tools. *Trends in Biochemistry* **4**:168-173
- Ghosh S** (1996) A novel ligation mediated-PCR based strategy for construction of subtraction libraries from limiting amount of mRNA. *Nucleic Acids Research* **24**:795-797
- Giraudat J, Hauge BM, Valon C, Smalle J, Parcy F, Goodman HM** (1992) Isolation of the Arabidopsis ABI3 gene by positional cloning. *Plant Cell* **4**: 1251-1261
- Goday A, Jensen AB, Cullianez-Malcia FA, Alba MM, Figueras M, et al.** (1994) The maize abscisic acid-responsive protein Rab17 is located in the nucleus and interacts with nuclear localization signal. *Plant Cell* **6**: 351-360
- Goffeau A, Borell BG, Bussey H, Davis RW, Dujon B, Feldmann H, Galibert F, Hoheisel JD, Jacq C, Johnston M, Louis M, Mewes HW, Murakami Y, Philippsen P, Tettelin H, Oliver SG** (1996) Life with 6000 genes. *Science* **274**: 546-567
- Graham D, Reed ML, Patterson BD, Hockley DG, Dwyer MR** (1984) Chemical properties, distribution, and physiology of plant and algal carbonic anhydrase. *Ann NY Acad Sci* **429**: 222-237
- Guyon JP, Kremer A** (1982) Stabilité de phénotypique de la croissance en hauteur et cinétique journalière de pression de sève et de la transpiration chez le pin maritime (*Pinus pinaster Ait.*). *Can J For Res* **12**: 936-946
- Gygax M, Gianfranceschi L, Gessler C** (1997) Development of polymorphic markers linked to the Vf resistance gene in apples: potential and problems of the representational difference analysis. *Bulletin Oib/Srop* **20**: 110-115
- Gygi SP, Rochon Y, Franz BR, Aebersold R** (1999) Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol Cellular Biology* **19**: 1720-1730

## H

- Habu Y, Fukada-Tanaka S, Hisatomi Y, Iida S** (1997) Amplified restriction fragment length polymorphism-based mRNA fingerprinting using a single restriction enzyme that recognizes a 4-bp sequence. *Biochem Biophys Research communications* **234**: 516-521
- Han B, Hughes DW, Galau GA, Bewley JD, Kermode AR** (1997) Changes in late-embryogenesis-abundant (LEA) messenger RNAs and dehydrins during maturation and premature drying of *Ricinus communis* L. *Planta* **201**: 27-35
- Han B, Kermode AR** (1996) Dehydrin-like proteins in castor bean seeds and seedlings are differentially produced in response to ABA and water-deficit-related stresses. *J Exp Bot* **47**: 933-939
- Hare PD, Cress WA** (1996) Metabolic implication of stress induced proline proline accumulation in plants. *Plant Growth Regulation* **21**: 79-102

- Harris AJ, Shaddock JG, Manjanatha MG, Lisenbey JA, Casciano DA** (1998) Identification of differentially expressed genes in aflatoxin B1-treated cultured primary rat hepatocytes and Fischer 344 rats. *Carcinogenesis* **19**: 1451-1458
- Hayashi HA, Mustardy L, Deshnum P, Ida M, Murata N** (1997) Transformation of *Arabidopsis thaliana* with the codA gene for choline oxidase: accumulation of glycine betaine and enhanced tolerance to salt and cold stress. *Plant J* **12**: 133-142
- Hayashi T, Makino K, Ohnishi M, Kurokawa K, Ishii K, Yokoyama K, Han CG, Ohtsubo E, Nakayama K, Murata T, Tanaka M, Tobe T, Iida T, Takami H, Honda T, Sasakawa C, Ogasawara N, Yasunaga T, Kuhara S, Shiba T, Hattori M, Shinagawa H** (2001) Complete genome sequence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and genomic comparison with a laboratory strain K-12. *DNA Res* **8**: 11-22.
- Haynes PA, Gygi SP, Figeys D, Aebersold R** (1998) Proteome analysis: biological assay or data archive?. *Electrophoresis* **19**: 1862-1871
- Heape MA, Juguelin H, Boiron F, Cassagne C** (1985) Improved one-dimensional thin layer chromatographic technique for polar lipids. *J Chrom* **322**: 391-395
- Hebsgaard SM, Korning PG, Tolstrup N, Engelbrecht J, Rouzé P, Brunak S** (1996) Splice site prediction in *Arabidopsis thaliana* DNA by combining local and global sequence information. *Nucleic Acids Research* **24**: 3439-3452
- Heidelberg JF, Eisen JA, Nelson WC, Clayton RA, Gwinn ML, Dodson RJ, Haft DH, Hickey EK, Peterson JD, Umayam L, Gill SR, Nelson KE, Read TD, Tettelin H, Richardson D, Ermolaeva MD, Vamathevan J, Bass S, Qin H, Dragoi I, Sellers P, McDonald L, Utterback T, Fleishmann RD, Nierman WC, White O** (2000) DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. *Nature* **3**: 477-83
- Hernandez JA, Jimenez A, Mullineaux P, Sevilla F** (2000) Tolerance of pea (*Pisum sativum* L.) to long-term salt stress is associated with induction of antioxidant defences. *Plant Cell Env* **23**: 853-862
- Hewitt G** (2000) The genetic legacy of the quaternary ice ages. *Nature* **405**: 907-913
- Hirai My, Suzuki H, Yamazaki M, Saito K** (2000) Biochemical and partial molecular characterization of bitter and sweet forms of *Lupinus angustifolius*, an experimental model for study of molecular regulation of quinolizidine alkaloid biosynthesis. *Chem Pharm Bull* **48**: 1458-1461
- Hiramaya T, Ohto C, Mizoguchi T, Shinozaki K** (1995) A gene encoding a phosphatidylinositol-specific phospholipase C is induced by dehydration and salt stress in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 3903-3907
- Holström K-O, Somersalo S, Mandal A, Palva TE, Welin B** (2000) Improved tolerance to salinity and low temperature in transgenic tobacco producing glycine betaine. *J Exp Bot* **51**: 177-185
- Hoyos ME, Zhang SO** (2000) Calcium-independent activation of salicylic acid-induced protein kinase and a 40-kilodalton protein kinase by hyperosmotic stress. *Plant Physiol* **4**: 1355-1363
- Hsieh HM, Huang PC** (1998) Promoter structure and activity of type 1 rice metallothionein-like gene. *DNA Sequence* **9**: 9-17
- Hughes L** (2000) Biological consequences of global warming: is the signal already. *Trends Ecol Evol* **15**: 56-61
- Humphery-Smith I, Cordwell SJ, Blackstock WP** (1997) Proteome research; complementarity and limitations with respect to the RNA and DNA worlds. *Electrophoresis* **18**: 1217-1242

**Humphery-Smith I, Corwell SJ, Blaackstock WP** (1997) Proteome research: complementarity and limitations with respect to the RNA and DNA worlds. *Electrophoresis* **18**: 1217-1242

## I

**Ichimura K, Mizoguchi T, Irie K, Morris P, Giraudat J, Matsumoto K, Shinozaki K** (1998) Isolation of ATMEKK1 (a MAP kinase, kinase, kinase) – interacting proteins and analysis of a MAP kinase cascade in Arabidopsis. *Biochem Biophys Res Commun* **253**: 532-543

**Ishitani M, Nakamura T, Han SY, Takabe T** (1995) Expression of the betaine aldehyde dehydrogenase gene in barley in response to osmotic stress and abscisic acid. *Plant Mol Biol* **27**: 307-315

**Iuchi S, Yamaguchi-Shinozaki K, Urao T, Terao T, Shinozaki K** (1996) Novel drought-inducible genes in the highly drought-tolerant cowpea: cloning of cDNA and analysis of the expression of the corresponding genes. *Plant Cell Physiol* **37**: 1073-1082

**Ivanova NB, Belyavssky AV** (1995) Identification of differentially expressed genes by restriction endonuclease-based gene expression fingerprinting. *Nucl Acid Res* **23**: 2954-2956

**Ivashuta S, Imai R, Uchiyama K, Gau M** (1999) The coupling of differential display and AFLP approaches for nonradioactive mRNA fingerprinting. *Mol Biotech* **12**: 137-141

## J

**Jan van Wijk K** (2000) Proteomics of the chloroplast: experimentation and prediction. *Trends in Plant Sci.* **5**:420-425

**Jones CS, Davies HV, Taylor MA** (2000) Profiling of changes in gene expression during raspberry (*Rubus idaeus*) fruit ripening by application of RNA fingerprinting techniques. *Planta*. **211**: 708-714

**Jones JT, Harrower, BE** (1998) A comparison of the efficiency of differential display and cDNA-AFLPs as tools for the isolation of differentially expressed parasite genes. *Fundam appl Nematol* **21**:81-88

## K

**Kalman S, Mitchell W, Marathe R, Lammel C, Fan J, Hyman RW, Olinger L, Grimwood J, Davis RW, Stephens RS** (1999) Comparative genomes of *Chlamydia pneumoniae* and *C. trachomatis*. *Nat Genet* **21**: 385-389

**Kaminaka H, Morita S, Tokumoto M, Masumura T, Tanaka K** (1999) Differential gene expressions of rice superoxide dismutase isoforms to oxidative and environmental stresses. *Free Radical Res.* **31**: 219-225

**Kasuga M, Liu Q, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K** (1999) Improving plant drought, salt and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nature Biotechnol* **17**: 287-291

**Kavi Kishor PB, Hong Z, Miao G-H, Hu C-AA, Verma DPS** (1995) Overexpression of pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. *Plant Physiol* **108**: 1387-1394

**Kehoe DM** (1999) DNA microarrays for studies of higher plants and other photosynthetic organisms. *Trends Plant Science* **4**: 38-41

- Kim JY, Chung YS, Paek KH, Park YI, Kim JK, Yu SN, Oh BJ, Shin JS** (1999) Isolation and characterization of a cDNA encoding the cysteine proteinase inhibitor, induced upon flower maturation in carnation using suppression subtractive hybridization. *Molecules & Cells* **9**: 392-398
- Kinlaw CS, Neale DB** (1997) Complex gene families in pine genomes. *Trends Plant Sci* **2**: 356-359
- Kiyosue T, Yoshiba Y, Yamaguchi-Schinozaki K, Schinozaki K** (1996) A nuclear proline dehydrogenase, an enzyme involved in proline metabolism, is up-regulated by proline but downregulated by dehydration in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **8**: 1323-1335
- Kleines M, Elster R-C, Rodrigo M-J, Blervacq A-S, Salamini F, Bartels D** (1999) Isolation and expression analysis of two stress-responsive sucrose-synthase genes from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* (Hochst.). *Planta* **209**: 13-24
- Kleinhenz M, Raffin A, Jactel H** (1998) Genetic parameters and gain expected from direct selection for resistance to *Dioryctria sylvestrella* Ratz. (Lepidoptera: Pyralidae) in *Pinus pinaster* Ait., using a full diallel mating design. *Forest Genetics* **5**: 147-154
- Koster KL** (1991) Glass formation and desiccation tolerance in seeds. *Plant Physiol* **88**: 829-832
- Kumar RG, Dubey RS** (1999) Glutamine synthetase isoforms from rice seedlings: effects of stress on enzyme activity and the protective roles of osmolytes. *J Plant Physiol* **155**: 118-121
- Kunst F, Ogasawara N, Moszer I, Albertini AM, Alloni G, Azevedo V, Bertero MG, Bessieres P, Bolotin A, Borchert S, Borriss R, Boursier L, Brans A, Braun M, Brignell SC, Bron S, Brouillet S, Bruschi CV, Caldwell B, Capuano V, Carter NM, Choi SK, Codani JJ, Connerton IF, Danchin A, et al.** (1997) The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* **390**: 249-256

## L

- Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W, Funke R, Gage D, Harris K, Heaford A, Howland J, Kann L, Lehoczky J, LeVine R, McEwan P, McKernan K, Meldrim J, Mesirov JP, Miranda C, Morris W, Naylor J, Raymond C, Rosetti M, Santos R, Sheridan A, Sougnez C, Stange-Thomann N, Stojanovic N, Subramanian A, Wyman D, Rogers J, Sulston J, Ainscough R, Beck S, Bentley D, Burton J, Clee C, Carter N, Coulson A, Deadman R, Deloukas P, Dunham A, Dunham I, Durbin R, French L, Grafham D, Gregory S, Hubbard T, Humphray S, Hunt A, Jones M, Lloyd C, McMurray A, Matthews L, Mercer S, Milne S, Mullikin JC, Mungall A, Plumb R, Ross M, Shownkeen R, Sims S, Waterston RH, Wilson RK, Hillier LW, McPherson JD, Marra MA, Mardis ER, Fulton LA, Chinwalla AT, Pepin KH, Gish WR, Chissole SL, Wendl MC, Delehaunty KD, Miner TL, Delehaunty A, Kramer JB, Cook LL, Fulton RS, Johnson DL, Minx PJ, Clifton SW, Hawkins T, Branscomb E, Predki P, Richardson P, Wenning S, Slezak T, Doggett N, Cheng JF, Olsen A, Lucas S, Elkin C, Uberbacher E, Frazier M, Gibbs RA, Muzny DM, Scherer SE, Bouck JB, Sodergren EJ, Worley KC, Rives CM, Gorrell JH, Metzker ML, Naylor SL, Kucherlapati RS, Nelson DL, Weinstock GM, Sakaki Y, Fujiiyama A, Hattori M, Yada T, Toyoda A, Itoh T, Kawagoe C, Watanabe H, Totoki Y, Taylor T, Weissenbach J, Heilig R, Saurin W, Artiguenave F, Brottier P, Bruls T, Pelletier E, Robert C, Wincker P, Smith DR, Doucette-Stamm L, Rubenfield M, Weinstock K, Lee HM, Dubois J, Rosenthal A, Platzer M, Nyakatura G, Taudien S, Rump A, Yang H, Yu J, Wang J, Huang G, Gu J, Hood L, Rowen L, Madan A, Qin S, Davis**

- RW, Federspiel NA, Abola AP, Proctor MJ, Myers RM, Schmutz J, Dickson M, Grimwood J, Cox DR, Olson MV, Kaul R, Raymond C, Shimizu N, Kawasaki K, Minoshima S, Evans GA, Athanasiou M, Schultz R, Roe BA, Chen F, Pan H, Ramser J, Lehrach H, Reinhardt R, McCombie WR, de la Bastide M, Dedhia N, Blocker H, Hornischer K, Nordsiek G, Agarwala R, Aravind L, Bailey JA, Bateman A, Batzoglou S, Birney E, Bork P, Brown DG, Burge CB, Cerutti L, Chen HC, Church D, Clamp M, Copley RR, Doerks T, Eddy SR, Eichler EE, Furey TS, Galagan J, Gilbert JG, Harmon C, Hayashizaki Y, Haussler D, Hermjakob H, Hokamp K, Jang W, Johnson LS, Jones TA, Kasif S, Kasprzyk A, Kennedy S, Kent WJ, Kitts P, Koonin EV, Korf I, Kulp D, Lancet D, Lowe TM, McLysaght A, Mikkelsen T, Moran JV, Mulder N, Pollara VJ, Ponting CP, Schuler G, Schultz J, Slater G, Smit AF, Stupka E, Szustakowki J, Thierry-Mieg D, Wagner L, Wallis J, Wheeler R, Williams A, Wolf YI, Wolfe KH, Yang SP, Yeh RF, Collins F, Guyer MS, Peterson J, Felsenfeld A, Wetterstrand KA, Patrinos A, Morgan MJ (2001) International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. **409**: 860-921
- Le Maitre DC** (1998) Pines in cultivation: a global view. In: Ecology and biogeography of Pinus, (ed Richardson, D.M.), pp407-431. Cambridge University Press, Cambridge, UK
- Lee JH, van Montagu M, Verbruggen N** (1999) A highly conserved kinase is an essential component of stress tolerance in yeast and plant cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 5873-5877
- Lee NH, Weinstock KG, Kirkness EF, Earle-Hughes JA, Fuldner RA, Marmaros S, Glodek A, Gocayne JD, Adams MD, Kerlavage AR** (1995) Comparative expressed-sequence-tag analysis of differential gene expression profiles in PC-12 cells before and after nerve growth factor treatment. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 8303-8307
- Lelu M-A, Bastien C, Drugeault A, Gouez M-L, Klimaszewska K** (1999) Somatic embryogenesis in plantlet development in *Pinus sylvestris* and *Pinus pinaster* on medium with growth regulators. *Physiologia plantarum*. **105**: 719-728
- Leprince O, Hendry GAF, McKersie BD** (1993) The mechanisms of desiccation tolerance in developing seeds. *Seed Sci Res* **3**: 321-346
- Leung J, Bouvier-Durand M, Morris P-C, Guerrier D, Chefdor F, Girauda J** (1994) Arabidopsis ABA responsive ABI1: features of a calcium-modulated protein phosphatase. *Science* **264**: 1448-1452
- Li HY, Guo ZF, Zhu YX** (1998) Molecular cloning and analysis of a pea cDNA that is expressed in darkness and very rapidly induced by gibberellic acid. *Mol General Genetics* **259**: 393-397
- Li Z-Y, Chen S-Y** (2000) Differential accumulation of the S-adenosylmethionine decarboxylase transcript in rice seedlings in response to salt and drought. *Theor Applied Genetics* **100**: 782-788
- Li Z-Y, Chen S-Y** (2001) Isolation, characterization and chromosomal location of a novel zinc-finger protein gene that is down-regulated by salt stress. *Theor Appl Genet* **102**: 363-368
- Liang P, Pardee AB** (1992) Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* **257**: 967-971
- Lilius G, Holmberg N, Bulow L** (1996) Enhanced NaCl stress tolerance in transgenic tobacco expressing bacterial choline dehydrogenase. *Biotechnol* **14**: 177-180
- Ling O, Overmars H, Helder J, Popeijus H, van der Voort RJ, Groenik W, van Koert P, Schots A, Bakker J, Smant G** (2000) An efficient cDNA-AFLP-based strategy for the identification of putative pathogenicity factors from the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. *Mol Plant Microbe Interaction* **13**: 830-836



- Lisitsyn NA, Lisitsina NM, Dalbagni G, Barker P, Sanchez CA, Gnarr J, Linehan WM, Reid BJ, Wigler MH (1995) Comparative genomic analysis of tumors: detection of DNA losses and amplification. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 151-155
- Liu GF, Liu GJ, Yang CP, Wang HM (1998) The analysis of hormonal change and salt-resistant ability of tree species under salt stress. *J Northeast For Univ* **26**: 1-4
- Lopez F, Vansuyt G, Fourcroy P, Casse-Delbart F (1994) Accumulation of a 22-Kda protein and its mRNA in the leaves of *Raphanus sativus* in response to salt stress or water deficit. *Physiologia Plantarum* **91**: 605-614
- Ludevid MD, Freire MA, Gomez J, Burd CG, Albericio F, et al (1992) RNA binding characteristics of a 16-kDa glycin-rich protein from maize. *Plant J* **2**: 999-1003

## M

- Maeda T, Takehara M, Saito H (1995) Activation of yeast PBS2 MAPKK by MAPKKKs or by binding of an SH3-containing osmosensor. *Science* **269**: 554-559
- Maeda T, Wurgler-Murphy SM, Saito H (1994) A two-component system that regulates an osmosensing MAP-kinase cascade in yeast. *Nature* **396**: 242-245
- Maggio A, Bressan RA, Hasegawa PM, Locy RD (1997) Moderately increased constitutive proline does not alter osmotic stress tolerance. *Physiologia Plantarum* **101**: 240-246
- Marcotte WR, Russel SH, Quatrano RE (1989) Abscisic acid responsive sequences from the Em gene of wheat. *Plant Cell* **1**: 969-976
- Marra MA, Hillier L, Waterson RH (1998) Expressed sequence tags – EST ablising bridges between genomes. *Trends in Genetics* **14**: 4-7
- Matsumura H, Nirasawa S, Terauchi R (2000) Transcript profiling in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings using serial analysis of gene expression (SAGE). *The Plant J* **20**: 716-726
- McClelland M, Mathieu-Daude F, Welsh J (1995) RNA fingerprinting and differential display using arbitrary primed PCR. *Trends Genet.* **11**:242-246.
- McCubbin WD, Kay CM (1985) Hydrodynamic and optical properties of the wheat Em protein. *Can J Biochem* **63**: 803-810
- McKaersie BD, Chen Y, Debens M, Bowley SR, Bowler C, Inze D, D'Halluin K, Botterman J (1993) Superoxide dismutase enhance tolerance of freezing stress in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiol* **103**: 1155-1163
- McLaughlin SB, Wimmer R (1999) Calcium physiology and terrestrial ecosystem processes. *New Phytol* **142**: 373-417
- Meinhart HZ (1996) Heavy metal detoxification in higher plants – a review. *Gene* **179**: 21-30
- Mekhedov S, Ilarduya OM, Ohlrogge J (2000) Toward a functional catalog of the plant genome. A survey of genes for lipid biosynthesis. *Plant Physiol* **122**: 389-401
- Meskiene I, Ligterink W, Bogre C, Kiegerl S, Balog J, Eklof S, Ammerer G, Hirt H (1998) The SAM kinase pathway: an integrated circuit for stress signaling in plants. *J Plant Res* **111**: 339-344
- Michalet X, Ekong R, Fougereuse F, Rousseaux S, Schurra C, Hornigold N, van Slegtenhorst M, Wolf J, Povey JS, Beckmann JS, Bensimon A (1997) Dynamic molecular combing: stretching the whole human DNA for high-resolution studies. *Science* **277**: 1518-1523
- Minati S, Johnson-Flanagan A (1998) Co-ordination of photosynthetic gene expression during low-temperature acclimation and development in *Brassica napus* cv. Jet Neuf leaves. *Plant Sci* **135**: 171-181
- Mitrovich Qm, Anderson P (2000) Unproductively spliced ribosomal protein mRNAs are natural targets of mRNA surveillance in *C. elegans*. *Genes Development* **14**: 2173-2184

- Mittler R, Zilinskas B** (1994) A Regulation of pea cytosolic ascorbate peroxidase and other antioxidant enzymes during the progression of drought stress and following recovery from drought. *Plant J* **5**: 397-405
- Money T, Reader S, Qu LJ, Dunfort RP, Moore G** (1996) AFLP-based mRNA fingerprinting. *Nucleic Acid Research* **24**: 2616-2617
- Moons A, De Keyser A, van Montagu M** (1997) A group 3 LEA cDNA of rice, responsive to abscisic acid, but not to jasmonic acid, shows a variety-specific differences in salt stress response. *Gene* **191**: 197-204
- Mudgett MB, Clarke S** (1994) Hormonal and environmental responsiveness of a developmentally regulated protein repair L-isoaspartyl methyltransferase in wheat. *J Biol Chem* **269**: 25605-25612
- Mundy J, Chua N-H** (1988) Abscisic acid and water-stress induce the expression of a novel rice gene. *EMBO J* **7**: 2279-2286
- Mundy J, Yamaguchi-Shinozaki K, Chua NH** (1990) Nuclear proteins bind conserved elements in the abscisic acid responsive promoter of rice rab gene. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 406-410
- Muramoto Y, Watanabe A, Nakamura T, Takabe T** (1999) Enhanced expression of a nuclease gene in leaves of barley plants under salt stress. *Gene* **2**: 315-321
- Myers T, Anderson N, Waltham M, Li G, Boulamwin J, Scudiero D, Pauli K, Sausville E, Weinstein J** (1997) A protein expression database for the molecular pharmacology of cancer. *Electrophoresis* **18**:647-653

## N

- Navarro JM, Jocarino JL** (1999) The use of arbitrarily primed polymerase chain reaction in cancer research. *Electrophoresis* **20**: 283-290
- Neale AD, Blomstedt CK, Broson P, Le T-N, Guthridge K, Evans J, Gaff DF, Hamill JD** (2000) The isolation of genes from the resurrection grass *Sporobolus stapfianus* which are induced during severe drought stress. *Plant Cell Env* **23**: 265-277
- Nguyen A, Lamant A** (1988) Pinitol and myo-inositol accumulation in water-stressed seedlings of maritime pine. *Phytochemistry* **27**: 3423-3427
- Nguyen A, Lamant A** (1989a) Effect of water stress on potassium distribution in young seedlings of maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.). *Ann Sci For* **46**: 379-383
- Nguyen A, Lamant A** (1989b) Variation in growth and osmotic regulation of roots of water-stressed maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.) provenances. *Tree Physiol* **5**: 123-133
- Nguyen-Querens A, Derré N, Lamant A, Seillac P** (1995) Tolérance au chlorure de sodium et sélectivité Na/K chez 3 races géographiques de pin maritime (*Pinus pinaster* Ait.) *Ann Sci For* **52**: 465-475
- Nierman WC, Feldblyum TV, Laub MT, Paulsen IT, Nelson KE, Eisen J, Heidelberg JF, AlleyMR, Ohta N, Maddock JR, Potocka I, Nelson WC, Newton A, Stephens C, Phadke ND, ElyB, DeBoy RT, Dodson RJ, Durkin AS, Gwinn ML, Haft DH, Kolonay JF, Smit J, Craven MB, Khouri H, Shetty J, Berry K, Utterback T, Tran K, Wolf A, Vamathevan J, Ermolaeva M, White O, Salzberg SL, Venter JC, Shapiro L, Fraser CM** (2001) Complete genome sequence of *Caulobacter crescentus*. *Proc Natl Acad Sci USA* [epub ahead of print]
- Ning Li F, Johnston M** (1997) Grr1 of *Saccharomyces cerevisiae* is connected to the ubiquitin proteolysis machinery through Skp1: coupling glucose sensing to gene expression and the cell cycle. *EMBO J* **16**: 5629-5638

- Niu X, Zhu J-K, Narasimhan ML, Bressan RA, Hasegawa PM** (1993) Plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase gene expression is regulated by NaCl in cells of the halophytes *Atriplex nummularia* L. *Planta* **190**: 433-438
- No EG, Flager RB, Swize MA, Cairney J, Newton RJ** (1997) cDNA induced by ozone from *Atriplex canescens* (saltbush) and their response to sulfur dioxide and water-deficit. *Physiologia plantarum* **100**: 137-146

## O

- O'Farrel PH** (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* **250**: 4007-4021
- O'Mahony PJ, Oliver MJ** (1999) The involvement of ubiquitin in vegetative desiccation tolerance. *Plant Mol Biol* **41**: 657-667
- Okubo K, Hori N, Matob R, Niiyama T, Fukushima A, Kojima Y, Matsubara K** (1992) Large scale cDNA sequencing for analysis of quantitative and qualitative aspects of gene expression. *Nat Genet* **2**: 173-179
- Okushima Y, Koizumi N, Kusano T, Sano H** (2000) Secreted proteins of tobacco cultured BY2 cells: identification of a new member of pathogenesis-related proteins. *Plant Mol Biol* **42**: 479-488
- Orita M, Iwahana H, Kanasawa H, Hayashi K, Seyka T** (1989) Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphism. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 2766-2770
- Ostersetzer O, Adam Z** (1997) Light-stimulated degradation of an unassembled rieske FeS protein by a thylakoid-bound protease: the possible role of FtsH protease. *Plant Cell* **9**: 957-965

## P

- Paakkonen S, Seppanen S, Holopainen T, Kokko H, Karenlampi S, Karenlampi L, Kangasjarvi J** (1998) Induction of genes for the stress proteins PR-10 and PAL in relation to growth, visible injuries and stomatal conductance in birch (*Betula pendula*) clones exposed to ozone and/or drought. *New Phytol* **138**: 295-305
- Pagès M, Vilardell J, Jensen AB, Albà MM, Torrent M, Goday A** (1993) Molecular biological responses to drought in maize. In *global Environmental Change, NATO Adv. Sci. Inst. Ser., Vol 116, Interacting Stresses on Plants in a Changing Climate* ed. Jackson MB, Black, pp. 583-591.
- Pandey A, Mann, M** (2000) Proteomics to study genes and genomes. *Nature* **405**: 837-846
- Parcy F, Valon C, Raynal M, Gaubier-Comella P, Delseny M, Giraudat J** (1994) Regulation of gene expression programs during *Arabidopsis* seed development: roles of the AB13 locus and of endogenous abscisic acid. *Plant Cell* **6**: 1567-1582
- Patterson S, Aebersold R** (1995) Mass spectrometric approaches for the identification of gel-separated proteins. *Electrophoresis* **16**: 1791-1814
- Peng Z, Lu Q, Verma DPS** (1996) Reciprocal regulation of synthase and proline dehydrogenase genes controls proline levels during and after osmotic stress in plants. *Mol Gen Genet* **253**: 334-341
- Pienta KJ, Schwab ED** (2000) Modified differential display technique that eliminates radioactivity and decreases screening time. *BioTechniques* **28**: 272-277
- Pilon-Smits EAH, Ebskamp MJM, Paul MJ, Jeuken MJW, Weisbeek PJ, and Smeekens SCM** (1995) Improved performance of transgenic fructan-accumulating tobacco under drought stress. *Plant physiol* **107**: 125-130

- Plomion C, Bahrman N, Durel C-E, O'Malley DM** (1995) Genomic mapping in *Pinus pinaster* (maritime pine) using RAPD and protein markers. *Heredity* **74**: 661-668
- Plomion C, Pionneau C, Brach J, Costa P, Baillières H** (2000) Compression wood-responsive proteins in developing xylem of maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.). *Plant Physiol* **123**: 959-969
- Postlethwait JH, Woods IG, Ngo-Hazelett P, Yan Y-L, Kelly PD, Chu F, Huang H, Hill-Force A, Talbot WS** (2000) Zebrafish comparative genomics and the origin of vertebrate chromosomes. *Genome Research* **10**: 1890-1902
- Prashar Y, Weissman SM** (1996) Analysis of differential gene expression by display of 3' end restriction fragments of cDNAs. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 659-663
- Pustovoitova TN, Bavrina TV, Zhdanova NE** (2000) Drought tolerance of transgenic tobacco plants carrying the *iaaM* and *iaaH* genes of auxin biosynthesis. *Russian J Plant Physiol* **47**: 380-385
- Pustovoitova TN, Bavrina TV, Zhdanova NE** (2000) Drought tolerance of transgenic tobacco plants carrying the *iaaM* and *iaaH* genes of auxin biosynthesis. *Russian Journal of Plant Physiology* **47**: 3, 380-385.

## Q

- Qin L, Overmars H, Helder J, Popeijus H, van der Voort JR, Groenink W, van Koert P, Schots A, Bakker J, Smant G** (2000) An efficient cDNA-AFLP-based strategy for the identification of putative pathogenicity factors from the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. *Mol Plant Microbe Interaction* **13**: 830-836
- Qin L, Prins P, Jones JT, Popeijus H, Smant G, Bakker J, Helder J** (2001) GenEST, a powerful bidirectional link between cDNA sequence data and gene expression profiles generated by cDNA-AFLP. *Nucleic Acids Research* **29**: 1616-1622
- Quarrie SA** (1982) Droopy: a wilted mutant of potato deficient in abscisic acid. *Plant Cell Env* **5**: 23-26

## R

- Reichheld JP, Gigot C, Chaubet-Gigot N** (1998) Multilevel regulation of histone expression during the cell cycle in tobacco cells. **26**: 3255-3262
- Rhodes D, Hanson AD** (1993) Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **44**: 357-384
- Ribeiro MM** (2001) Genetics of *Pinus pinaster* Aiton with cytoplasmic and nuclear markers. PhD thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Umea, Sweden
- Rivolta MN, Wilcox ER** (1995) A novel and simple methodology to generate subtracted cDNA libraries. *Nucleic Acids Research* **23**: 2565-2566
- Robinson E, Dooley T, Williams K** (1998) UV-induced melanoma cell lines and their potential for proteome analysis: A review. *The J. Exp. Zoology* **282**: 48-53
- Rogel-Gaillard C** (2000) Les banques de grands fragments. *Production Animales, Vol Hors série: Génétique moléculaire : principes et application aux populations animales*. INRA (eds), Versailles, France, 79-85
- Rothschild CB, Brewer CS, Offden DW** (1997) DD/AP-PCR: combination of differential display and arbitrarily primed PCR of oligo(dT) cDNA. *Analytical Biochemistry*. **245**: 48-54
- Rouzé P, Pavy N, Rombauts S** (1999) Genome annotation: which tools do we have for it?. *Current Opinion in Plant Biology* **2**: 90-95

Roxas VP, Smith RK Jr, Allen ER, Allen RD (1997) Overexpression of glutathione-S-transferase/glutathione peroxidase enhances the growth of transgenic tobacco seedlings during stress. *Nature Biotechnol* **15**: 988-991

## S

- Sabbah S, Raise M, Tal M (1995) Methylation of DNA in NaCl-adapted cells of potato. *Plant Cell Reports* **14**: 467-470
- Saiki RK, Gelfand Dh, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1987) Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-491
- Saito K, Kobayashi M, Gong Z, Tanaka Y, Yamazaki M (1999) Direct evidence for anthocyanidin synthase as a 2-oxoglutarate dependent oxygenase: molecular cloning and functional expression of cDNA from a red forma of *Perilla frutescens*. *Plant J.* **17**:181-189
- Sambrook J, Fritsh EF, Maniatis T (1989) Small-scale preparation of plasmid DNA. *Molecular cloning a laboratory manual* **1**: 25-28
- Sasaki T, Burr B (2000) International rice genome sequencing project: the effort to completely sequence the rice genome. *Current Opinion in Plant Biology* **3**: 138-141
- Savenstrand H, Brosche M, Anghagen M, Strid A (2000) Molecular markers for ozone stress isolated by suppression subtractive hybridization: specificity of gene expression and identification of a novel stress-regulated gene. *Plant Cell Env* **23**: 689-700
- Savouré A, Jaoua S, Hua XueJun, Ardiles W, van Montagu M, Verbruggen N (1995) Isolation, characterization, and chromosomal location of a gene encoding the DELTA 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters* **372**: 13-19
- Saylor LC (1964) Karyotype of Pinus-group Lariciones. *Silvae Genetica* **6**: 165-170
- Schaffer MA, Fisher RL (1988) Analysis of mRNAs that accumulate in response to low temperature identifies athiol protease gene in tomato. *Plant Physiol* **87**: 431-436
- Schena M (1996) Genome analysis with gene expression microarrays. *BioEssays* **18**: 427-431
- Schraml P, Shipman R, Stulz P, Ludwig CU (1993) cDNA subtraction library construction using a magnet-assisted subtraction technique (MAST). *Trends in Genetics* **9**:70-71
- Schroeder JL (1995) Anion channels as central mechanisms for signal transduction in guard cells and putative functions in roots for plant-soil interactions. *Plant Mol Biol* **28**: 353-361
- Schvester D, Ughetto F (1986) Différences de sensibilité à *Matsucoccus feytaudi* Duc (Homoptera : Margarodidae) selon les provenances de pin maritime (*Pinus pinaster* Ait.) *Ann Sci For* **43**: 459-474
- Seillac P (1960) Contribution à l'étude de la nutrition du pin maritime : variation saisonnières de la teneur des pseudophylles en azote, potassium et acide phosphorique. PhD thesis, Université Bordeaux I, France
- Sheveleva E, Chmara W, Bohert HJ, Jensen RG (1997) Increased salt and drought tolerance by D-ononitol production in transgenic *Nicotiana tabacum* L. *Plant Physiol.* **115**: 1211-1219
- Silhavy D, Hutvagner G, Barta E, Banfalvi Z (1995) Isolation and characterization of water-stress-inducible cDNA clone from *Solanum chacoense*. *Plant Mol Biol* **27**: 587-595
- Sivamani E, Bahieldin A, Wraith JM, Al-Niemi T, Dyer WE; Ho THD, Qu RD (2000) Improved biomass productivity and water use efficiency under water deficit conditions in transgenic wheat constitutively expressing the barley HVA1 gene. *Plant Science* **155**: 1-9

- Snedden WA, Fromm H** (1998) Calmodulin, calmodulin-related proteins and plant responses to the environment. *Trends Plant Sci* **3**: 299-304
- Soares MB, Bonaldo MF, Jelene P, Su L, Lawton L, Efstratiadis A** (1994) Construction and characterization of a normalized cDNA library. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **91**: 9228-32
- Song P, Yamamoto E, Allen RD** (1995) Improved procedure for differential display of transcript from cotton tissues. *Plant Mol Biol Rep* **13**: 174-181
- Spencer VA, Davie JR** (1999) Role of covalent modifications of histones in regulating gene expression. *Gene* **240**:1-12.
- Steponkus PI, Uemura M, Joseph RA, Gilmour S, Thomashow MF** (1998) Mode of action of the COR15a gene on the freezing tolerance of *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 14570-14575
- Sterky F, Regan S, Karlson J, Hertzberg M, Rohde A, Holmberg A, Amini B, Bhalerao R, Larsson M, Villarreal R, van Montagu M, Sandberg G, Olsson O, Teeri TT, Boerjan W, Gustafsson P, Uhlén M, Sundberg B, Lundeberg J** (1998) Gene discovery in the wood-forming tissues of poplar: analysis of 5,692 expressed sequence tags. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 13330-13335
- Stollberg J, Urschitz J, Urban Z, Boyd CD** (2000) A quantitative evaluation of SAGE. *Genomic Research* **10**: 1241-1248
- Stroher VL, Maclagan JL, Good AG** (1997) Molecular cloning of a *Brassica napus* cystein protease gene inducible by drought and low temperature stress. *Physiologia plantarum* **101**: 389-397
- Suarez MC, Bernal A, Gutierrez J, Tohme J, Fregene M** (2000) Developing expressed sequence tags (ESTs) from polymorphic transcript-derived fragments (TDFs) in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Genome* **43**: 62-67

## T

- Tabaeizadeh Z** (1998) Drought-induced responses in plant cells. *Int Rev Cytol* **182**: 193-247
- Taberlet P, Fumagalli L, Wustsaucy AG, Cosson JF** (1998) Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular Ecology* **7**: 453-464
- Tarczynski MC, Jensen RG, Bohert HJ** (1993) Stress protection of transgenic tobacco by production of the osmolyte mannitol. *Science* **259**: 508-510
- Tettelin H, Saunders NJ, Heidelberg J, Jeffries AC, Nelson KE, Eisen JA, Ketchum KA, Hood DW, Peden JF, Dodson RJ, Nelson WC, Gwinn ML, DeBoy R, Peterson JD, Hickey EK, Haft DH, Salzberg SL, White O, Fleischmann RD, Dougherty BA, Mason T, Ciecko A, Parksey DS, Blair E, Cittone H, Clark EB, Cotton MD, Utterback TR, Khouri H, Qin H, Vamathevan J, Gill J, Scarlato V, Massignani V, Pizza M, Grandi G, Sun L, Smith HO, Fraser CM, Moxon ER, Rappuoli R, Venter JC** (2000) Complete genome sequence of *Neisseria meningitidis* serogroup B strain MC58. *Science* **287**: 1809-1815
- The Arabidopsis Genome Initiative** (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**: 796-815
- The C. elegans Genome Consortium** (1999) How the worm was won. The *C. elegans* genome sequencing project. *Trends Genet* **15**: 51-58
- The C. elegans Sequencing Consortium** (1998) Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science* **282**: 2012-2018
- The C. elegans Sequencing Consortium** (1999) How the worm was won. The *C. elegans* genome sequencing project. *Trends in Genetics* **15**: 51-58

- Thevissen K, Cammue BPA, Lemaire K, Winderickx J, Dickson RC, Lester RL, Ferket KKA, van Even F, Parret AHA, Broekaert WF** (2000) gene encoding a sphingolipid biosynthesis enzyme determines the sensitivity of *Saccharomyces cerevisiae* to an antifungal plant defensin from dahlia (*Dahlia merckii*). *Proc Natl Aca Sci USA* **97**: 9531-9536
- Thiellement H, Bahrman N, Damerval C, Plomion C, Rossignol M, Santoni V, de Vienne D, Zivy M** (1999) Proteomics for genetic and physiological studies in plants. *Electrophoresis* **20**: 2013-2026
- Thomas JC, Sepahi M, Arendall B, Bohert HJ** (1995) Enhancement of seed germination in high salinity by engineering mannitol expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Envir* **18**: 801-806
- Tolstrup N, Rouzé P, Brunak S** (1997) A branch point consensus from *Arabidopsis* found non-circular analysis allows for better prediction of acceptor sites. *Nucleic Acids Research* **25**: 3159-3163
- Tongaonkar P, Chen L, Lambertson D, Ko B, Madura K** (2000) Evidence for an interaction between ubiquitin-conjugating enzymes and the 26S proteasome. *Mol Cell Biol* **20**: 4691-4698
- Triboulot M-B** (1996) Effets du stress osmotique et de la carence en potassium sur la croissance racinaire du pin maritime. Etude biomécanique du grandissement cellulaire. PhD thesis, Université Henri Poincaré Nancy I, France
- Tudela D, Primo-Millo E** (1992) 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid transported from roots to shoots promotes leaf abscission in Cleopatra mandarin (*Citrus reshni* Hort. Ex Tan.) seedlings rehydrated after water stress. *Plant Physiol* **100**: 131-137

## U

- Uberbacher EC, Mural RJ** (1991) Locating protein coding regions in human DNA sequences using a multiple sensor-neural network approach. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 11261-11265
- Umeda M, Hara C, Matsubayashi Y, Li HH, Liu Q, Tadokoro F, Aotsuka S, Uchimiya H** (1994) Expressed sequence tags from cultured cells of rice (*Oryza sativa* L.) under stressed conditions: analysis of transcripts of genes engaged in ATP-generating pathways. *Plant Mol Biol* **25**: 469-478
- Urao T, Yamaguchi-Shinozaki K, Urao S, Shinozaki K** (1993) An *Arabidopsis* myb homolog is induced by dehydration stress and its gene products binds to the conserved MYB recognition sequence. *Plant Cell* **5**: 1529-1539
- Urao T, Yakubov B, Satoh R, Yamaguchi-Shinozaki K, Seki M, Hirayama T, Shinozaki KA** (1999) transmembrane hybrid-type histidine kinase in *Arabidopsis* functions as an osmosensor. *Plant Cell* **11**: 1743-1754

## V

- van der Biezen EA, Juwana H, Parker JE, Jones JD** (2000) cDNA-AFLp display for the isolation of *Peronospora parasitica* genes expressed during infection in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant Microbe Interaction* **13**: 895-898
- Velculescu VE, Madden SI, Zhang L, Lash AE, Yu J, Rago C, Lal A, Wang CJ, Beaudry GA, Ciriello KM** (1999) Analysis of human transcriptomes. *Nat Genet* **23**: 387-388
- Velculescu VE, Zhang L, Vogelstein B, Kinzler KW** (1995) Serial analysis of gene expression. *Science* **270**: 484-487

- Velculescu VE, Zhang L, Zhou W, Vogelstein J, Basrai MA, Basset DEJ, Hieter P, Vogelstein B, Kinzler KW (1997) Characterization of the yeast transcriptome. *Cell* 88:243-251
- Venter G, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA, Holt RA, Gocayne JD, Amanatides P, Ballew RM, Huson DH, Wortman JR, Zhang Q, Kodira CD, Zheng XH, Chen L, Skupski M, Subramanian G, Thomas PD, Zhang J, Miklos GLG, Nelson C, Broder S, Clark AG, Nadeau J, McKusic VA, Zinder N, Levine AJ, Roberts RJ, Simon M, Slayman C, Hunkapiller M, Bolanos R, Delcher A, Dew I, Fasulo D, Flanigan M, Florea L, Halpern A, Hannenhalli S, Kravitz S, Levy S, Mobarry C, Reinert K, Remington K, Abu-Threideh J, Beasley E, Biddick K, Bonazzi V, Brandon R, Cargill M, Chandramouliswaran I, Charlab R, Chaturvedi K, Deng Z, Di Francesco V, Dunn P, Eilbeck K, Evangelista C, Gabrielian AE, Gan W, Ge W, Gong F, Gu Z, Guan P, Heiman TJ, Higgins ME, Ji R-R, Ke Z, Ketchum KA, Lai Z, Lei Y, Li Z, Li J, Liang Y, Lin X, Lu F, Merkulov GV, Milshina N, Moore HM, Naik AK, Narayan VA, Neelam B, Nusskern D, Rush DB, Salzberg S, Shao W, Shue B, Sun J, Wang ZY, Wang A, Wang X, Wang J, Wie M-H, Wides R, Xiao C, Yan C, Yao A, Ye J, Zhan M, Zhang W, Zhang H, Zhao Q, Zheng L, Zhong F, Zhong W, Zhu SC, Zhao S, Gilbert D, Baumhueter S, Spier G, Carter C, Cravchik A, Woodage T, Ali F, An H, Awe A, Baldwin D, Baden H, Barnstead M, Barrow I, Beeson K, Busam D, Carver A, Center A, Cheng ML, Curry L, Danaher S, Davenport L, Desilets R, Dietz S, Dodson K, Doup L, Ferreira S, Garg N, Gluecksmann A, Hart B, Haynes J, Haynes C, Heiner C, Hladun S, Hostin D, Houck J, Howland T, Ibegwam C, Johnson J, Kalush F, Kline L, Koduru S, Love A, Mann F, May D, McCawley S, McIntosh T, McMullen I, Moy M, Moy L, Murphy B, Nelson K, Pfannkoch C, Pratts E, Puri V, Qureshi H, Reardon M, Rodriguez R, Rogers Y-H, Romblad D, Ruhfel B, Scott R, Sitter C, Smallwood M, Stewart E, Strong R, Suh E, Thomas R, Tint NN, Tse S, Vech C, Wang G, Wetter J, Williams S, Williams M, Windsor S, Winn-Deen E, Wolfe K, Zaveri J, Zaveri K, Abril JF, Guigo R, Campbell MJ, Sjolander KV, Karlak B, Kejariwal A, Mi H, Lazareva B, Hatton T, Narechania A, Diemer K, Muruganujan A, Guo N, Sato S, Bafna V, Istrail S, Lippert R, Schwartz R, Walenz B, Yooseph S, Allen D, Basu A, Baxendale J, Blick L, Caminha M, Carnes-Stine J, Caulk P, Chiang Y-H, Coyne M, Dahlke C, Deslattes Mays A, Dombroski M, Donnelly M, Ely D, Esparham S, Folser C, Gire H, Glanowski S, Glasser K, Glodek A, Gorokhov M, Graham K, Gropman B, Harris M, Heil J, Henderson S, Hoover J, Jennings D, Jordan C, Jordan J, Kasha J, Kagan L, Kraft C, Levitsky A, Lewis M, Liu X, Lopez J, Ma D, Mojonos W, McDaniel J, Murphy S, Newman M, Nguyen T, Nguyen N, Nodell M, Pan S, Peck J, Peterson M, Rowe W, Sanders R, Scott J, Simpson M, Smith T, Sprague A, Stockwell T, Turner R, Venter E, Wang M, Wen M, Wu D, Wu M, Xia A, Zandieh A, Zhu X (2001) The sequence of the human genome. *Science* 291: 1304-1351
- Vernon DM, Ostrem JA, Bonhert HJ (1993) Stress perception and response in a facultative halophyte: the regulation of salinity-induced genes in *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant Cell Env* 16: 437-444
- Vinyals A, Alia P, Llorens A, Adrover M, Gonzalez-Garrigues M, Masramon L, Peinado MA, Fabra A (1998) Detection of differentially expressed gelatinase A in metastatic and non-metastatic subpopulations of tumor cells by target RNA arbitrarily primed polymerase chain reaction (TRAP-PCR). *Clinical & Experimental Metastasis*. 16:603-11



- Voiblet C, Duplessis S, Encelot N, Martin F** (2001) Identification of symbiosis-regulated genes in *Eucalyptus globulus-Pisolithus tinctorius* ectomyccorrhiza by differential hybridization of arrayed cDNAs. *The Plant J* **25**: 181-191
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M** (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acid Research* **23**: 4407-4414

## W

- Wang J, Zhang H, and Allen RD** (1999) Overexpression of an Arabidopsis peroxisomal ascorbate peroxidase gene in tobacco increases protection against oxidative stress. *Plant Cell Physiol* **40**: 725-732
- Wang RC, Guegler K, LaBrie ST, Crawford NM** (2000) Genomic analysis of a nutrient response in Arabidopsis reveals diverse expression patterns and novel metabolic and potential regulatory genes induced by nitrate. *Plant Cell* **12**: 1491-1509
- Wang X, Brownstein MJ, Young WS** (1996) Sequence analysis of PG10.2, a gene expressed in the pineal gland and the outer nuclear layer of the retina. *Brain Research Molecular Brain Research* **41**:269-78
- Wang XR, Tsumura Y, Yoshimaru H, Nagasaka K, Szmidt AE** (1999) Phylogenetic relationships of Eurasian pines (*Pinus*, pinaceae) based on chloroplast *rbcL*, *matK*, *rpl20-rps18* spacer, and *trnV* intron sequences. *American J Botany* **86**: 1742-1753
- Waters ER, Garrett J, Vierling E** (1996) Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants. *J Exp Bot* **47**: 325-338
- Watson JD, Crick FHC** (1953) Molecular structure of nucleic acids. *Nature* **171**: 737-738
- Wei T, O'Connell** (1996) Structure and characterization of a putative drought-inducible H1 histone gene. *Plant Mol Biol* **30**: 255-268
- Welham T, O'Neill M, Johnson S, Wang TL, Domoney C** (1998) Expression patterns of genes encoding seed trypsin inhibitors in *Pisum sativum*. *Plant Sci* **131**: 13-24
- Welsh J, McClelland M** (1990) Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research* **18**: 7213-7218
- White JA, Todd J, Newman T, Focks N, Girke T, de Ilàrduya MO, Jaworski JG, Ohlrogge JB, Benning C** (2000) A new set of Arabidopsis expressed sequence tags from developing seeds. The metabolic pathway from carbohydrates to seed oil. *Plant Physiol* **124**: 1582-1594
- Williams RJ, Leopold AC** (1989) The glassy state in corn embryos. *Plant Physiol* **89**: 977-981
- Winicov I, and Bastola DR** (1999) Transgenic overexpression of the transcription factor *Alfin1* enhances expression of the endogenous *MsPRP2* gene in alfalfa and improve salinity tolerance of the plants. *Plant Physiol* **120**: 473-480
- Wolfraim LA, Langis R, Tyson H, Dhindsa RS** (1993) cDNA sequence, expression, and transcript stability of a cold acclimation-specific gene, *cas18*, of alfalfa (*Medicago falcata*) cells. *Plant Physiol* **101**: 1275-1282
- Woods IG, Kelly PD, Chu F, Ngo-Hazelett P, Yan Y-L, Huang H, Postlethwait JH, Talbot WS** (2000) A comparative map of the zebrafish genome. *Genome Research* **10**: 1903-1914

## X

- Xu D, Duan X, Wang B, Hong B, Ho TD, Wu R** (1996) Expression of a late embryogenesis abundant protein gene, HVA1, from barley confers tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice. *Plant Physiol* **110**: 249-257
- Xu W, Campbell P, Vargeese AK, Braam J** (1996) The Arabidopsis XET-related gene family : environmental and hormonal regulation of expression. *Plant J* **9**: 879-889.

## Y

- Yamaguchi-Schinozaki K, Koisumi M, Urao S, Schinozaki K** (1992) Molecular cloning and characterization of 9 cDNAs for genes that are responsive to desiccation in *Arabidopsis thaliana*: sequence analysis of one that encodes a putative transmembrane channel protein. *Plant Cell Physiol* **33**: 217-224
- Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K** (1994) A novel cis-acting element in Arabidopsis gene is involved in responsiveness to drought, low temperature or high salt stress. *Plant Cell* **6**: 251-264
- Yamanaka A, Matsuda Y, Okuda T, Sagisaka S** (1995) Characterization of oligo(dT)-binding proteins from seedlings of winter wheat. *Sil Sci Plant Nutrition* **41**: 183-193
- Yang GP, Ross DT, Kuang WW, Brown PO, Weigel RJ** (1999) Combining SSH and cDNA microarrays for rapid identification of differentially expressed genes. *Nucleic Acid Research* **27**: 1517-1523
- Yerle M** (2000) Etablissement des cartes génétiques. Production Animales, Vol Hors série: Génétique moléculaire : principes et application aux populations animales. INRA (eds), Versailles, France, 87-101
- Yoshida Y, Kiyosue T, Katagiri T, Ueda H, Mizoguchi T, Yamaguchi-Shinozaki K, Wada K, Harada Y, Shinozaki K** (1995) Correlation between the induction of a gene for DELTA 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase and the accumulation of proline in *Arabidopsis thaliana* under osmotic stress. *Plant Journal* **7**: 751-760
- Yu H, Goh C** (2000) Identification and characterization of three orchid MADS-box genes of the AP1/AGL9 subfamily during floral transition. *Plant Physiol.* **123**:458-464
- Yung M, Schaffer R, Putterill J** (1999) Identification of genes expressed during early Arabidopsis carpel development by mRNA differential display: characterisation of ATCEL2, a novel endo-1,4-beta-D-glucanase gene. *Plant J.* **17**:203-208

## Z

- Zarembinski TI, Theologis A** (1994) Ethylene biosynthesis and action: a case of conservation. *Plant Mol Biol* **26**: 1579-1597
- Zegzouti H, Jones B, Marty C, Lelièvre J-M, Latché A, Pech J, Bouzayen M** (1997) ER5, a tomato cDNA encoding an ethylene-responsive LEA-like protein: characterization and expression in response to drought, ABA and wounding. *Plant Mol Biol* **35**: 847-854
- Zegzouti H, Marty C, Jones B, Bouquin T, Latché A, Pech JC, Bouzayen M** (1997) Improved screening of cDNAs generated by mRNA differential display enables the selection of true positives and the isolation of weakly expressed messages. *Plant mol Biol Rep* **15**: 236-245
- Zhou LJ., Ye CL** (1999) Effect of high temperature stress on metabolism of nitrogen and carbohydrates in seedlings of cucumber. *J Fujian Agricultural University* **28**: 3, 289-293
- Zhu B, Su J, Chang MC, Verma DPS, Fan YL, Wu Ray** (1998) Overexpression of a pyrroline-5-carboxylate synthetase gene and analysis of tolerance to water and salt stress in transgenic rice. *Plant Sci* **139**: 41-48

**Zhu YX, Zhang YF, Luo JC, Davies PJ, Ho DTH** (1998) PPF-1, a post-floral-specific gene expressed in short-day-grown G2 pea, may be important for its never-senescing phenotype. *Gene* 1: 1-6

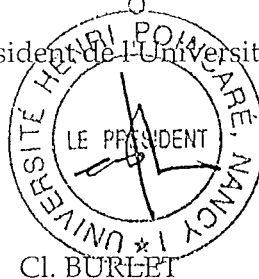
Monsieur DUBOS Christian

DOCTORAT de l'UNIVERSITE HENRI POINCARÉ, NANCY-I  
en BIOLOGIE FORESTIERE

VU, APPROUVÉ ET PERMIS D'IMPRIMER

Nancy, le 13 juillet 2004 n° 535

Le Président de l'Université



La sécheresse constitue un traumatisme majeur limitant la croissance et le développement des végétaux. Dans le cas des espèces longévives comme le pin maritime, le déficit d'alimentation en eau doit être considéré à deux échelles de temps : une sécheresse estivale à court terme, et une augmentation globale de la température accompagnée de fluctuations climatiques importantes à l'échelle du siècle. Cette modification du climat coïncide avec le pas de temps d'un programme d'amélioration génétique. Il est donc essentiel dès maintenant de prendre en compte cette dimension adaptative, si l'on veut disposer de matériel adapté aux conditions environnementales futures. Etant donné la complexité du caractère et l'absence de prédicteurs simples de la tolérance à la sécheresse, cette composante n'a pas encore été prise en compte dans les programmes d'amélioration. Notre étude s'inscrit dans le cadre d'un programme de recherche multidisciplinaire visant à identifier des critères de sélection phénotypique ou moléculaire. Elle se focalise sur la réponse moléculaire de jeunes plants de pin maritime soumis à un déficit d'alimentation en eau en milieu hydroponique. Une étude d'expression ciblée menée au niveau du transcriptome (criblage différentiel utilisant la technique de l'AFLP sur ADNc) a été réalisée à partir des ARNm extraits des parties aériennes et des racines de plants ayant ou non subi un stress hydrique. Elle a permis d'identifier 81 gènes régulés par le stress, dont : 48% sont homologues à des gènes de fonctions connues (pour la plupart décrits comme impliqués dans la réponse au stress hydrique), 19% correspondent à des protéines inconnues d'*Arabidopsis thaliana* et 33% sont des nouvelles séquences. Pour 40% des gènes, des études d'expression complémentaires (Northern, RT-PCR) ont permis d'une part de valider leur expression différentielle et d'autre part d'étudier leur spécificité tissulaire. L'étude de la régulation du transcriptome a été complétée par une analyse de la variation de l'accumulation des protéines extraites des aiguilles, de tiges et de racines des mêmes plants. La comparaison des profils d'électrophorèse bidimensionnelle entre des conditions non stressées et stressées a montré que 12% des protéines étaient affectés par le déficit d'alimentation en eau.

**Mots-clefs :** gènes de stress hydrique, *Pinus pinaster* Ait., ADNc-AFLP, électrophorèse bidimensionnelle des protéines

---

Drought greatly affects the growth and development of plants. For long lived woody species, such as maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.), water deprivation should be considered not only in the short-term, i.e. summer drought, but also in the long-term because of the influence of global warming. Such climatic modifications will coincide with the time lag required to achieve a breeding cycle. The maintenance of sufficient growth under stress conditions will therefore require the availability of varieties or natural resources that are adapted to present and future climatic conditions, if major losses are to be avoided. Due to the complex nature of drought-stress response and the lack of simple predictive parameters to tolerance, genetic improvement of such characteristics has not yet been considered in forest tree breeding programs. Our study is in keeping with an interdisciplinary program for the identification of phenotypic and molecular selection criteria. This thesis focuses on the molecular mechanisms involved in water-deficit response, of young maritime pine seedlings growing in a hydroponic medium. An expression study carried out at the transcriptome level (differential screening using the cDNA-AFLP technique) was developed using mRNA extracted from control and stress conditions for both the aerial part and the roots. We identified 81 drought-stress responsive genes, from which 48% corresponded to known function genes (most of them already described as being involved in drought-stress response), 19% corresponded to hypothetical protein from *Arabidopsis thaliana*, and 33% were novel sequences. Expression studies (Northern, RT-PCR) were performed for 40% of these genes, allowing the validation of their differential expression and their tissue specificity to be investigated. The transcriptomic approach was completed by the analysis of protein accumulation in needles, stems and roots. Two-dimensional gel electrophoresis patterns were compared between the same control and stress conditions. 12% of the analysed proteins were affected by water deprivation.

**Key-words :** drought-responsive genes, *Pinus pinaster* Ait., cDNA-AFLP, two-dimensional gel electrophoresis