



HAL
open science

Caractérisation de certains impacts de la mutation Laurina chez *Coffea arabica* L. aux niveaux histo-morphologique et moléculaire

Aurélie Lecolier

► **To cite this version:**

Aurélie Lecolier. Caractérisation de certains impacts de la mutation Laurina chez *Coffea arabica* L. aux niveaux histo-morphologique et moléculaire. Sciences de la Terre. Université de la Réunion, 2006. Français. NNT: . tel-00468113

HAL Id: tel-00468113

<https://theses.hal.science/tel-00468113>

Submitted on 30 Mar 2010

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.

ACADEMIE DE LA REUNION

Institut de Recherche pour le Développement
UMR 141 « Diversité des Plantes Cultivées »
Equipe « Génomique des caféiers »

Université de la Réunion/CIRAD
UMR C53 « Peuplements Végétaux et
Bioagresseurs en Milieu Tropical »

THESE

Présentée à l'Université de la Réunion
Pour obtenir le titre de DOCTEUR EN SCIENCES
Formation doctorale : Ecole Doctorale Interdisciplinaire

Caractérisation de certains impacts de la mutation *Laurina* chez *Coffea arabica* L. aux niveaux histo-morphologique et moléculaire

Par

Aurélie LECOLIER

Soutenue le 11 décembre 2006 devant la commission d'examen :

M. NOIROT , Directeur de Recherche – IRD, La Réunion	Directeur de Thèse
P. BESSE , Professeur – Université de la Réunion	Co-directrice de Thèse
A. CHARRIER , Professeur- ENSA, Montpellier	Rapporteur
J. TREGEAR , Directeur de Recherche – IRD, Montpellier	Rapporteur
G. THOMAS , Professeur - ENSA, Rennes	Examineur
D. STRASBERG , Professeur - Université de la Réunion	Examineur

Remerciementsssssss

Quand on commence une thèse on n'est jamais sûr de ce qu'il va en résulter, de ce que sera le manuscrit et surtout de son contenu. Mais ce que j'ai toujours su depuis le début, c'est qu'il y aurait de nombreux remerciements. J'ai appris énormément en trois ans de thèse, sur le plan professionnel mais aussi humain, et tout cela grâce à de nombreuses personnes. Quelques mots dans ma thèse, c'est encore très peu pour leur montrer toute ma gratitude.

Je remercie tout d'abord la Région Réunion pour m'avoir accordée sa bourse et pour avoir financé mes recherches. Un grand merci à Serge HAMON qui m'a accueilli dans son UMR « Diversité et Génome des Plantes Cultivées » à Montpellier. Merci en particulier pour son soutien tant apprécié tout au long des épisodes à rebondissement de ma thèse et pour tout ce qu'il a dû faire et supporter. Merci à Alexandre DE KOCHKO d'avoir accepté que je fasse mes travaux dans son équipe « Génomique des caféiers ». Merci aussi à Bernard REYNAUD pour avoir accepté d'accueillir une squatteuse de plus de l'équipe IRD dans son centre de recherche du Pôle de Protection des plantes à la Réunion ;

Mes plus vifs remerciements à :

- Michel Noirot ("Tomorrow will be a new day"). Une personne à qui je porte une estime inconditionnelle. Je n'ai pas toujours été facile à vivre, comme première thésardE, et je crois qu'il n'a pas choisi la plus simple ! Merci de ne pas avoir tenu compte de mon « sale » caractère. Je te souhaite de toujours sourire à la vie et de continuer à faire si bien partager ton savoir. Merci pour les discussions à bâtons rompus dépassant largement souvent le cadre de la thèse, pour son encadrement et son soutien. C'était un peu mission impossible de me réconcilier avec les statistiques, comme quoi tout arrive ;-)
- Pascale BESSE sans qui il n'y aurait jamais eu d'inscription en thèse. Merci d'avoir accepté de prendre cette responsabilité supplémentaire ;
- André CHARRIER : Pour avoir été là dès qu'il le fallait malgré toutes ses responsabilités. Merci de m'avoir fait confiance et toute ma gratitude pour avoir accepté de juger mon travail ;
- Grégoire THOMAS : rares sont ceux qu'on peut citer comme ayant réellement déterminé un choix de vie. Grâce à un certain module d'Amélioration des plantes au tout début de ma 1^{ère} année dans son école d'ingénieur il a réussi à me faire revenir sur ma décision d'après prépa de ne jamais travailler en Biologie Végétale... Le fait qu'il accepte aujourd'hui d'être examinateur est réellement un grand honneur ;
- James TREGGAR : toute ma reconnaissance d'avoir accepté le travail de rapporteur. Malgré les corrections, je me doute bien que certaines coquilles existent encore, mais on a (normalement...) évité les pires comme les « doubler par deux », « des cellules plus petites mais moins grandes » ou encore « la plus petite longueur de la hauteur »... ;
- Jean-Luc VERDEIL : Cette thèse ne serait pas du tout la même sans sa présence et ses conseils. Je n'aurai jamais pensé que le jour de notre rencontre allait autant apporter de bonnes choses et de changements dans mon travail. Ces quelques lignes sont bien peu pour vous montrer ma reconnaissance ;
- Hervé CHRESTIN, pour sa très grande patience, ses connaissances du laboratoire et son optimisme inattaquable (et pourtant mis si souvent à rude épreuve !!). Pour avoir su garder jusqu'au bout une part de café dans la masse de l'hévéa ;
- Thierry JOET : un peu tombé par hasard dans tout cela, merci de m'avoir supporté, conseillé, rassuré et aidé. Tout mon courage et tout le bonheur du monde pour la suite.

Je remercie également toutes les équipes de Montpellier et d'ailleurs qui m'ont accueillies le temps d'une expérience, ou plus, et qui m'ont permis d'avancer mes recherches. En particulier toute ma gratitude va à « Genetrop » et au « 3P » au complet, car je suis sûre d'avoir au moins ennuyée au moins une fois pour ma thèse toutes les personnes de ces

« grandes équipes » !!!! Merci à toutes celles qui m'ont apportées à un moment donné un sourire, un fou rire, une écoute, et qui ont réussi à mettre tant de bonne humeur durant ces années. Clin d'œil au CEA de Cadarache, DEVM, laboratoire d'Ecophysiologie de la photosynthèse (responsable Bernard Genty) et au CIRAD de Lavalette (Mpl).

J'ai eu de nombreux maîtres de stages « officieux », qui ont pris de leur temps pour m'apprendre à « manipuler » et faire avancer mes travaux. Merci à Ericka BULLIER, première à me montrer comment me servir d'une pipette (!), Thierry BEULE pour m'avoir supporté tant de fois avec un calme olympien, Sylvie DOULBEAU pour l'HPLC, Jacques ESCOUTE qui a eu raison avec moi en outre la cire méristématique du café.

Il y a des gens que l'on n'oublie pas, qui passent rapidement à l'échelle humaine mais qui marquent. C'est pour cela que je voudrais remercier Pierre TROUSLOT, pour avoir été là au tout début, pour m'avoir toujours ouvert son laboratoire et sa « terrasse » magique sur les toits de l'IRD de Montpellier. Merci de m'avoir donné un peu de patience, de l'écoute et de m'avoir appris les bases de la biologie moléculaire.

Je remercie mes stagiaires (on peut dire « cobayes » aussi il paraît !) : Walou, tu as été le premier et je m'en excuse encore. Merci pour ton sourire et ta présence durant ma dernière année. Je ne sais pas comment tu as pu accepté de revenir dans mon équipe mais je t'en suis reconnaissante ! Merci aussi d'avoir été le « photographe officiel » de la thèse. Aurélie, merci d'avoir osé mettre ton stage de dernière année entre mes mains (ou mes gants !). Je te souhaite à toi aussi tout le bonheur du monde. Tony, toi aussi tu as osé le faire, chapeau pour m'avoir supportée pour l'obtention de nos derniers résultats. Bon courage pour la suite. Jordi, dernière recrue de l'équipe, je te cite ici même si tu es loin d'avoir été un de mes stagiaires (mais cobaye oui !), ça serait même le contraire vu que tu as plutôt tenté de me former à la Q-PCR, mais je tiens à te remercier pour ta patience et ces six derniers mois à me soutenir.

Je remercie particulièrement la sympathique troupe, collègues devenus amis, qui m'a permis d'avoir tant de bons souvenirs : Valérie (un rhum arrangé ?), Nathalie (alors l'Italie ?...), Arnaud et Céline (Bientôt finis vous aussi ! Tenez le coup !), Eric (le swing je vous dit, le swing...), Anne (je ne t'oublie pas !) et les CIRADiens de dessous les cocotiers : Sophie, Séverine, Delphine's, Karine's, Fred, Nathalie et Jaela.

Enfin dans les derniers, mais non les moindres, merci à tous mes amis non-chercheurs qui m'ont soutenue et supportée durant cette expérience. Vous y avez tous cru pour moi :

Les Montpelliérains : Bruno (merci, merci mille fois), Laurent (on va à la plage, en rando, au lac du Salagou ?...), Noizzzette (copine depuis un certain jour de plage), David (alors tu débarques quand ?), les salseros (on bouge quand vous voulez ! Plus d'excuses !)

Les réunionnais : Valou (je n'échangerais pour rien au monde mes retrouvailles avec toi !!), Anita (Merci de ton calme à tout épreuve), Elodie (restes zen pitite pile électrique !),

Les inclassables ;-) : Emilie (comment tu fais pour être là depuis si longtemps ??), Maud (à quand notre coloc' internationale ??), Franck (toujours dans mon cœur), Isa (pitite marseillaise expatriée), Olivia (loin des yeux près du cœur...), Mélanie (les hasards font bien les choses... notre rencontre autour d'une paillasse en est une...), Nelson (et non, je ne t'oublie pas...), Johanna et Stephanie (Toujours là depuis 6 ans... déjà ??).

Et la famille, la dernière citée mais celle qui a le plus de place dans mon cœur. Je sais que cette thèse c'est un peu la votre et que sans vous elle ne serait pas terminée. Merci pour tout, et c'est encore peu de le dire.

Et toutes mes excuses aux innombrables caféiers qui ont prêté ou sacrifié leur corps à la/ma science ... jamais plus je n'en croiserai un de cette façon !! Derniers clins d'œil perso à une frise qui m'a bien donnée du fil à retordre, aux virus « Cheval de Troie » (la bataille fut rude...) et aux bonnes ondes positives, dont celle de Salazie...

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS	6
LISTES DES FIGURES	8
LISTES DES TABLEAUX	11
INTRODUCTION GENERALE	13
Chapitre I - Synthèse bibliographique	
I- LE CAFEIER	18
I.1 Taxonomie botanique	18
I.2 Structure génétique	18
I.3 Mode de reproduction	19
I.4 Caractéristiques morphologiques, phénologiques et physiologique	20
II- ORIGINE ET EVOLUTION DE C. ARABICA	21
II.1 Structure du génome et hypothèses sur l'origine de C. arabica	21
II.2 Les deux bases génétiques majeures cultivées : Typica et Bourbon	21
III- Histoire du café à la Réunion et plus particulièrement du Bourbon	23
III.1 Introduction du café	23
III.2 Découverte du café indigène Mauritiana	25
III.3 Diffusion des plants	25
III.4 Ere de prospérité du café	26
III.4 Abandon de la culture	28
IV- LES MUTATIONS NATURELLES DE C. ARABICA ET EN PARTICULIER CELLE DE LA MUTATION LAURINA	31
IV.1 Les principaux mutants naturels de C. arabica	31
IV.2 La mutation Laurina	34
IV.2.1 Mise en évidence de la variété Bourbon pointu	34
IV.2.1.1 Diversité des caféiers arabica existant à la Réunion	34
IV.2.1.2 L'origine du café Leroy ou [Bourbon] pointu	35
IV.2.2 Analyses génétiques et biochimiques de la mutation	38
V- CARACTERISATION DES MUTANTS NATURELS	39
V.1 Mutations et épimutations naturelles	40
V.1.1 Caractéristiques des mutations génétiques	40
V.1.1.1 Définition	40
V.1.1.2 Modalités d'apparition et fréquence des mutations	41
V.1.1.3 Propriétés des mutations	42
V.1.2 Caractéristiques des épimutations	44
V.1.2.1 Définition des épimutations	44
V.1.2.2 Modalités d'apparition des épimutations	45
V.1.2.3 Propriétés des épimutations	47
V.1.3 Cas particulier des chimères	50
V.2 Identification, localisation et clonage de la région mutée	51
V.2.1 Cas du changement de niveau de ploïdie, d'aneuploïdie ou de modifications structurelles de chromosomes	52
V.2.1.1 Identification d'un changement de ploïdie	52
V.2.1.2 Identification d'une aneuploïdie	53
V.2.1.3 Identification et localisation d'une translocation ou d'une inversion	54
V.2.2 Cas des mutations génétiques et épigénétiques	54
V.2.2.1 Cas du changement de niveau de ploïdie, d'aneuploïdie ou de modification structurelle de chromosome	54
V.2.2.2 Cas des mutations génétiques et épigénétiques	56
V.2.2.3 Cas des caractères dont l'expression est gouvernée à la fois par des gènes à contrôle génétique simple et complexe	57
V.2.3 Positionnement et identification de la région mutée sur le génome	58
V.2.3.1 Localisation de la région mutée sur le génome	58

V.2.3.2	Clonage de la région mutée	59
V.2.3.3	Validation de la région isolée comme étant la mutation recherchée	63
V.3	Caractérisation des effets de la mutation	66
V.3.1	Analyse au niveau du phénotype visuel	66
V.3.1.1	Description des effets de la mutation par l'écophysiologie	67
V.3.1.2	Caractérisation phénologique des effets de la mutation	68
V.3.1.3	Analyse des effets de la mutation au niveau cellulaire	69
V.3.2	Analyse au niveau du métabolome	70
V.3.3	Analyse au niveau du protéome	72
V.3.4	Analyse au niveau du transcriptome	74
V.3.4.1	Analyses moléculaires basées sur l'amplification PCR et le séquençage	75
V.3.4.2	Les techniques comparant les transcriptomes du mutant par le sauvagement par hybridation	77

Chapitre II – Description histologique et macroscopique du Bourbon Pointu **80**

I	INTRODUCTION	81
II	MATERIELS ET METHODES	83
II.1	Matériel végétal	83
II.2	Coupes histologiques	84
II.3	Notations et analyses faites sur les apex caulinaires	85
II.3.1	Observations microscopiques	85
II.3.2	Observations macroscopiques	85
II.3.3	Analyses statistiques	85
II.4	Expériences sur la longueur des entre-nœuds	86
II.4.1	Comparaison des variétés au stade juvénile	86
II.4.2	Origine des différences observées au niveau de la taille de l'axe orthotrope	86
II.4.3	Analyse macroscopique sur les variations de port entre les deux variétés	87
II.4.4	Analyses statistiques sur les variations de longueur d'entre-nœud et d'architecture de l'arbre	88
II.4.4.1	Origine des différences observées au niveau de la taille de l'axe orthotrope	88
II.4.4.2	Analyse concernant les variations de port	88
II.5	Action de la gibbérelline exogène	89
III	RESULTATS	90
III.1	Fonctionnement de l'apex chez <i>C. arabica</i> var. Bourbon	90
III.1.1	Description macroscopique de l'initiation et le développement d'un phytomère	90
III.1.2	Description de coupes de l'apex	91
III.1.3	Description microscopique de l'apex	91
III.2	Les impacts de la mutation <i>Laurina</i> sur les différents paramètres relatifs à l'apex	92
III.2.1	Sur le plastochrone et l'accroissement en taille de la plante	92
III.2.2	Sur la structure de l'apex	93
III.2.3	Sur les dimensions de l'apex	93
III.2.4	Sur les relations d'allométrie entre les dimensions de l'apex	94
III.3	Mise en évidence et origine des différences induites par la mutation concernant la taille de la plante	95
III.3.1	Comparaison entre Bourbon et Bourbon pointu à un stade juvénile	95
III.3.1.1	Jeunes plants âgés de cinq mois	95
III.3.1.2	Treize mois plus tard	96
III.3.2	Taille et forme des cellules à l'origine des différences de longueur d'entre-nœud	96
III.3.3	Nombre de cellules à l'origine des différences de longueur d'entre-nœuds	97
III.3.4	Fréquence relative de mères et d'auxèses dans L1, L2 ; L3 et L4	98
III.4	Impact de la mutation sur le port de l'arbre	98
III.4.1	Origine macroscopique des variations de port chez les arbres adultes	98
III.4.2	Origine cellulaire des différences de port chez les arbres adultes	99
III.5	Action de la gibbérelline exogène	100
III.5.1	Au début du traitement (T0)	100
III.5.2	A la fin du traitement (T1)	100
III.5.2.1	Croissance des entre-nœuds déjà présents au temps T0	100
III.5.2.2	Nombre de nouveaux entre-nœuds (plastochrone)	100
III.5.3	Un mois après la fin du traitement (T2)	101
III.5.3.1	Longueur moyenne des nouveaux entre-nœuds apparus	101

III.5.3.2	Nombre de nouveaux entre-nœuds	101
III.5.4	Action sur la forme des feuilles	101
III.5.4.1	Comparaison entre B et BP non traités	101
III.5.4.2	Chez le Bourbon	101
III.5.4.3	Chez le Bourbon pointu	101
IV	DISCUSSION	102
IV.1	Effets de la mutation <i>Laurina</i> sur l'apex caulinaire	102
III.1.1	Description de la structure et du fonctionnement de l'apex et du méristème apical caulinaire chez le Bourbon	102
III.1.2	Effets de la mutation <i>Laurina</i> sur l'apex et la taille du méristème apical caulinaire	103
III.1.3	Le cas particulier du plastochrone	105
III.1.4	Conclusions	105
IV.2	Effets de la mutation sur l'élongation et la division cellulaire avec les conséquences induites sur la taille des entre-nœuds	106
III.2.1	La mutation <i>Laurina</i> affecte à la fois l'élongation (l'auxèse) et la division (mérèse) cellulaire	106
IV.2.1.1	Les entre-nœuds du Bourbon ont une croissance typique d'autres dicotylédones ligneuses	107
IV.2.1.2	L'effet de la mutation <i>Laurina</i> sur le profil classique de croissance de l'entre-nœud	108
IV.2.1.3	Les effets de la mutation <i>Laurina</i> sur le diamètre de la moelle	109
IV.2.1.4	Le comportement du Bourbon pointu est similaire à celui d' <i>Helianthus annuus</i> en condition de stress hydrique	109
III.2.2	Perspectives	109
IV.3	Effet de la mutation sur le port de l'arbre	110
IV.3.1	La croissance relative entre les axes plagiotropes et orthotrope à l'origine du changement de port induit par la mutation <i>Laurina</i>	111
IV.3.2	L'angle de branchement entre les axes plagiotropes et orthotropes chez les mutants reste typique du type Bourbon	112
IV.3.3	Conclusions et perspectives	113
IV.4	La mutation <i>Laurina</i> modifie des phénomènes directement liés à l'action d'hormones	113
IV.4.1	Le Bourbon pointu répond classiquement à l'application de GA	115
IV.4.2	La mutation <i>Laurina</i> modifie la réponse à l'application de GA	116
IV.4.2.1	Le Bourbon pointu répond à la gibbérelline exogène	116
IV.4.2.2	La réponse à la gibbérelline sur le Bourbon pointu n'est pas complète	117
IV.4.3	Hypothèses portant sur la modification de l'action d'hormones endogènes par la mutation <i>Laurina</i>	118

Chapitre III – Recherches de gènes différentiellement exprimés 120

I	INTRODUCTION	121
II	MATERIEL ET METHODES	123
II.1	Analyse préliminaire de la variabilité génétique en AFLP	123
II.1.1	Matériel végétal	123
II.1.2	Extraction au sorbitol et dosage de l'ADN	124
II.1.3	Purification de l'ADN	124
II.1.4	Dosage de l'ADN	124
II.1.4	Protocole AFLP	124
II.2	Préparation des ARN totaux	125
II.2.1	Matériel végétal	125
II.2.1.1	Echantillonnage	125
II.2.1.2	Précautions à prendre	126
II.2.2	Extraction des ARN totaux	126
II.2.2.1	Méthode	126
II.2.2.2	Quantification des ARN totaux	126
II.3	Construction de banque soustractive	127
II.4	Clonage des séquences d'intérêt	128
II.4.1	Ligation et transformation bactérienne	128
II.4.2	Sélection et analyse des colonies	128
II.4.3	Extraction et purification des plasmides	129
II.4.4	Séquençage	128
II.5	Analyses bioinformatiques des séquences et classement	129
II.5.1	Traitement bioinformatique	129

II.5.2 Classement des séquences	130
II.6 Elaboration des filtres à ADN de moyenne densité (<i>macro-arrays</i>)	131
II.6.1 Préparation des cibles	131
II.6.1.1 Amplification des sondes à partir des clones bactériens	132
II.6.1.2 Précipitation de l'ADN et dosage	132
II.6.2 Définition de l'organisation des membranes	132
II.6.3 Dépôt automatisé des cibles sur les membranes	133
II.6.4 Fabrication des sondes complexes à partir des ARN totaux	133
II.6.5 Conditions d'hybridations, révélation du signal et acquisition des images	134
II.7 Analyse des données issues des hybridations <i>macro-arrays</i>	135
II.7.1 Vérification de la soustraction de banques	135
II.7.2 Reproductibilité entre les filtres	135
II.7.3 Analyse du bruit de fond	135
II.7.4 Méthode d'analyse statistique pour trouver les différentiels d'expression	135
II.7.4.1 Indépendance entre bruit de fond et signal	135
II.7.4.2 Analyse des témoins négatifs	136
II.7.4.3 Analyse des témoins positifs	136
II.7.4.4 Recherche des sources de variations liées à la technique des <i>macro-arrays</i>	137
II.7.4.5 Mise en évidence du différentiel d'expression entre Bourbon et Bourbon pointu	137
II.8 Validation par RT-PCR	138
II.8.1 Dessin des amorces	138
II.8.2 Traitement des ARN	138
II.8.3 Obtention des ADNc	139
II.8.4 Conditions de PCR et quantification du signal	140
II.8.5 Validation du différentiel d'expression	141
II.9 Validation par Northern	142
II.9.1 Préparation de la membrane	142
II.9.2 Marquage de la sonde – Hybridation	142
II.9.3 Lavages – Exposition	143
III RESULTATS	143
III.1 Vérification préliminaires concernant l'homogénéité génétique de chacune des souches et leur différenciation	143
III.2 ESTs analysées dans les banques SSH d'Arabica	144
III.2.1 Résultats du séquençage	144
III.2.2 Classements des ESTs	144
III.2.2.1 Classement préliminaire selon la probabilité d'homologie de la fonction de l'EST	145
III.2.2.2 Classement selon la fonction de l'EST	145
III.3 Obtention des <i>macro-arrays</i>	146
III.2.1 Résultats des amplifications des clones bactériens	146
III.2.2 Hybridation des <i>macro-arrays</i> avec les ADNc soustraits obtenus par la méthode SSH	147
III.2.3 Estimation de la variabilité inter filtre	147
III.4 Mise au point d'une méthodologie d'analyse statistique des signaux radioactifs à partir des témoins	147
III.4.1 Transformation des données	148
III.4.2 Sources d'hétérogénéité du bruit de fond	148
III.4.3 Elimination des points aberrants du bruit de fond	148
III.4.4 Correction des valeurs brutes par le bruit de fond	149
III.4.5 Vérification sur les témoins négatifs	149
III.4.6 Vérification de la réponse à des concentrations différentes	150
III.4.7 Mise en évidence d'une source d'hétérogénéité liée au tube d'hybridation	150
III.4.8 Conclusions	151
III.5 Identification de gènes différentiellement exprimés	152
III.5.1 Classement des ESTs par rapport aux témoins négatifs	152
III.5.2 Cas des ESTs de la classe 4 montrant un différentiel quantitative d'expression entre Bourbon et Bourbon pointu	153
III.5.2.1 ESTs différentiellement exprimés sur les filtres SSHbp	154
III.5.2.2 ESTs différentiellement exprimés sur les filtres SSHb	154
III.6 Validation par RT-PCR semi-quantitative et Northern des gènes montrant une différence d'expression lors des <i>macro-arrays</i>	154
III.6.1 Premières sélections de 37 clones.	155
III.6.2 Validation de dix gènes candidat par RT semi-quantitative	155
III.6.2.1 Analyse du témoin Ubiquitine	156
III.6.2.2 Un exemple d'analyse	156

III.6.2.3 Synthèse des résultats pour tous les clones	157
III.6.3 Validation de quatre gènes par Northern	158
IV DISCUSSION	158
IV.1 Le Bourbon et le Bourbon pointu sont très similaires	158
IV.2 Les banques soustraites comme outil d'analyse du transcriptome	159
IV.2.1 Comparaison des classes fonctionnelles des banques SSHbp et SSHb	159
IV.2.2 Pertinence de la technique SSH utilisée	161
IV.3 Interprétation des résultats issus de filtre haute densité	162
IV.3.1 Variabilité existant dans les analyses <i>macro-arrays</i>	163
IV.3.1.1 Hétérogénéité des filtres entre eux	163
IV.3.1.2 Bruit de fond	164
IV.3.1.3 Marquage	164
IV.3.2 Mise au point de critères de validation concernant le différentiel d'expression dans notre plan d'expérimentation	166
IV.3.2.1 Validation de résultats obtenus par RT-PCR et interprétation des paramètres d'ajustement	166
IV.3.2.2 Dispositif expérimental et analyse statistique des RT-PCR	167
IV.3.2.3 Critère de validation des <i>macro-arrays</i>	167
IV.3.2.4 Validation en Northern blot sur d'autres stades de développement	168
IV.3.3 Gènes différenciellement exprimé par la mutation <i>Laurina</i>	169

Chapitre IV – Discussion générale, conclusions et perspectives	171
---	------------

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	176
------------------------------------	------------

<i>Annexes</i>	199
----------------	------------

Annexe 1 : Protocole AFLP	200
Annexe 2 : Electrophorèse sur gel d'acrylamide	202
Annexe 3 : Solutions pour extraction des ARN totaux	203
Annexe 4 : Protocole de la construction des banques SSH	204
Annexe 5 : Composition du gel dénaturant pour Northern	207
Annexe 6 : Tableaux des ESTs regroupées dans les classes 2 et 3 après les tests de Dunnet	208
Annexe 7 : Résultats des ANOVA faits sur les ESTs regroupées dans la classe 4	210
Annexe 8 : Stade de développement des prélèvements	213

LISTE DES ABREVIATIONS

Les abréviations présentées ici sont celles communément utilisées dans tout le document. Certaines abréviations, spécifiques d'une expérimentation donnée, sont présentées dans la partie « Matériel et Méthodes » correspondante.

ADN :	Acide Desoxyribonucléique
ADNc :	Acide Desoxyribonucléique complémentaire
AIA :	Auxine (acide β indole acétique)
AFLP :	Amplified Fragment Length Polymorphism
ARN :	Acide Ribonucléique
ARNm :	Acide ribonucléique messenger
ARNr :	Acide ribonucléique ribosomique
ATP :	Adénosine Tri Phosphate
BET (ou EtBr):	Bromure d'éthidium
BP :	<i>Coffea arabica</i> variété Laurina ou Bourbon Pointu
B :	<i>Coffea arabica</i> Type sauvage Bourbon Rond
<i>C. arabica</i> :	<i>Coffea arabica</i> appelé aussi Arabica
cDNA :	Copy deoxyribonucleic acid
CIRAD:	Centre de coopération Internationale en Recherché Agronomique pour le Développement
DEPC :	Diéthyl pyrocarbonate
dNTP :	Désoxyribonucléotides triphosphate
EDTA :	EthyleneDiamine Tetraacetic Acid
EST(s) :	Expressed Sequence Tag ou Etiquettes de séquences exprimées
GAs :	Gibbérellines
GFP :	Green Fluorescent Protein
IAA :	Acide 3-indole-acétique
IRD :	Institut de Recherche pour le Développement
MAC :	Méristème apical Caulinaire
MATAB :	Mixed Alkyl Trimethyl Ammonium Bromide
MOPS :	MorpholinoPropaneSulfonic acid
NaCl :	Chlorure de sodium
PCI :	Phénol-Chloroforme alcool Isoamylique
PCR :	Polymerase Chain Reaction ou réaction de polymérisation en chaîne
PE :	Perkin-Elmer (nom d'un type de thermocycleur)
Poly-A⁺ :	Queues polyadénylées des ARN
QTL :	Quantitative Trait Locus (i)
RT :	Reverse Transcriptase
SDS :	Sodium Dodecyl Sulfate
SSC :	Sodium Chloride / Sodium Citrate
SSH :	Suppression Subtractive Hybridization ou Technique de banque soustraite
TAE :	Tris Acetate EDTA
TRIS :	Tris(Hydroxymethyl)Aminomethane

Unités :

kg : kilogramme

mg : milligramme

µg : microgramme

ng : nanogramme

pg : picogramme

rpm : rotation par minute

pb : paire de bases

M : molaire

h : heure

min : minute

ppm : part per million

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

Figure I.1 : Distribution géographique des groupes phylogénétiques établis par l'analyse de séquences ITS2 de l'ADN ribosomique de 37 taxons de caféiers (Lashermes <i>et al.</i> , 1997).	19
Figure I.2 : Différents parties de l'architecture d'un caféier d'après Moens (1962)	20
Figure I.3 : Représentation schématique des tissus présents dans le fruit de <i>Coffea</i> sp. à maturité (200 à 250 jours après fécondation) (De Castro et Marraccini, 2006)	20
Figure I.4 : Schéma illustrant l'origine de <i>C. arabica</i> L (tiré de Herrera, 2003).	21
Figure I.5 : Caractéristiques morphologiques du Bourbon (à gauche sur les figures) et du Bourbon pointu (à droite sur les figures). A) Port général des arbres B) Graines C) Feuilles	34
Figure I.6 : Bourbon pointu présentant des réversions somatiques au niveau de certaines branches. Arbres présents sur des plantations de Nouvelle Calédonie. (Photos Serge Hamon, IRD Montpellier).	37
Figure I.7 : Modèle de maintenance des profils de méthylation CpG de l'ADN, au cours de la réplication.	44
Figure I.8 : Phénotype de l'inflorescence <i>peloric</i> .	45
Figure I.9 : Exemples de gènes soumis au phénomène de paramutation chez le maïs.	47
Figure I.10 : Phénotype du variant épigénétique semi-dominant <i>bal</i> chez <i>Arabidopsis</i> , apparu en contexte mutant <i>ddm1</i> . (D'après Stokes <i>et al.</i> , 2002).	48
Figure I.11 : Phénotypes des épimutations <i>agamous</i> (<i>ag</i>) et <i>superman</i> (<i>sup</i>) au niveau des fleurs chez <i>Arabidopsis</i> .	49
Figure I.12 : Schéma d'une coupe longitudinale d'un méristème de dicotylédone.	49
Figure I.13 : Schéma du développement (1 à 3) des différents types de chimères, méricline, péricline et sectorielle. En bleu, la cellule mutée et les cellules qui en sont issues	49
Figure I.14 : Exemple de panachure des feuilles chez l'agave (<i>Agave americana</i>).	50
Figure I.15 : Principe de la méthode BSA appliquée sur une population F2 en ségrégation pour le gène de résistance R/sensibilité r (Michelmore <i>et al.</i> , 1991). La bande épaisse correspond au locus dominant lié à l'allèle de résistance.	57
Figure I.16 : Technique de l'Ecotilling.	59
Figure I.17 : Fleurs d' <i>Antirrhinum majus</i> L. de différents génotypes Niv*/niv-571 montrant des événements de réversion somatiques indépendants. (D'après Bollman <i>et al.</i> , 1991)	64
Figure I.18 : Fruits mûres de <i>Citrus sinensis</i> cv. Navelate (fruits orangés) et de <i>Citrus sinensis</i> mutant Pinalate (fruits jaunes)	70
Figure I.19 : Diagramme de la chaîne de biosynthèse des caroténoïdes chez les plantes.	71

CHAPITRE II

Figure II.1 : Représentation schématique d'un méristème avec ses primordia permettant de visualiser les mesures prises.	84
Figure II.2 : Diagramme montrant les différentes mesures faites au sommet de chaque plant.	86
Figure II.3 : Phases macroscopiques d'émergence de feuille chez <i>C. Arabica</i> var. Bourbon	89
Figure II.4 : Description de coupes de l'apex.	90

Figure II.5 : Absence de différence dans la structure de l'apex du Bourbon et du Bourbon pointu.	91
Figure II.6 : Description microscopique de l'apex au niveau du méristème.	92
Figure II.7 : Relation d'allométrie existant entre le diamètre (D3) de l'ébauche foliaire (« Leaf anlage width ») et sa hauteur (H1) (« Leaf anlage height ») durant leur développement. Les mesures sont exprimées en μm .	93
Figure II.8 : Relation d'allométrie existant entre la hauteur de l'ébauche foliaire (H2) (« Shoot apex height) et le diamètre D1 de l'apex (« Shoot apex diameter ») durant le développement. Les mesures sont exprimées en μm .	93
Figure II.9 : Longueurs d'entre-noeud chez les plantes âgées de cinq mois des variétés Bourbon (B) et Bourbon pointu (BP) s'étant développés à la Réunion (RUN) ou) Montpellier (MPL).	94
Figure II.10 : Forme cellulaire dans la moelle aux emplacements E1 et E3 le long de l'axe orthotrope chez les variétés Bourbon et Bourbon pointu. Une barre représente 100 μm .	96
Figure II.11 : Variations de taille et de forme des cellules de la moelle à quatre emplacements (E1, E 2, E3, E 4) chez les deux variétés Bourbon et Bourbon pointu.	96
Figure II.12 : Relation entre le rapport Ri (rapport de la longueur plagio/ortho) et la variable « i » indiquant l'ordre d'insertion des axes plagiotropes le long de l'axe orthotrope. Les entre-nœuds ont été numérotés à partir du sommet de l'arbre.	96
Figure II.13 : Représentation (à l'échelle) des cinq derniers entre-nœuds du Bourbon et du Bourbon pointu.	98
Figure II.14: Description histologique de l'organisation du méristème apical avec indications des points où agirait la GA exogène.	117
CHAPITRE III	
Figure III.1 : Les cinq étapes de la technique AFLP. Cette technique permet de révéler un polymorphisme de site de restriction et d'hybridation des bases arbitraires.	124
Figure II.2 : Protocole d'extraction des ARN totaux par centrifugation sur coussin de chlorure de césium	126
Figure III.3 : Principales étapes de la construction d'une banque soustraite type SSH suivant le protocole du kit « PCR-select cDNA Substraction » de Clontech.	126
Figure III.4 : Electrophorèse des produits PCR sur gel d'agarose	131
Figure III.5 : Organisation des filtres à partir d'un motif en quatre (à gauche) et motif en cinq (à droite)lors de l'analyse des hybridations avec l'emplacement en noir du bruit de fond (BdF). Un motif regroupe l'ensemble des quatre produits d'amplification de même coordonnée pour les quatre plaques 384.	131
Figure III.6 : Electrophorèse des ARN sur gel d'agarose en conditions dénaturantes (A) et transfert sur membrane de nitrocellulose (B).	141
Figure III.7 : Classement « Préliminaire regroupé » tenant compte uniquement la probabilité d'homologie avec des séquences de fonction connue. Pour la SSHbp, le classement a été effectué à partie de 974 séquences, pour la SSHb à partir de 957 séquences.	144
Figure III.8 : Classement des ESTs selon leur fonction. Seules les ESTs présentant une forte homologie de fonction lors du premier classement sont analysées. Pour la SSHbp, 526 ESTs ont été classées, et 584 chez la SSHb	

Figure III.9 : Classement dans la catégorie « Protéine et gène ». Pour la SSHbp, 280 ESTs ont été classées, et 111 chez la SSHb.	144
Figure III.10 : Classement dans la catégorie « Métabolisme primaire ». Pour la SSHbp, 94 ESTs ont été classées, et 101 chez la SSHb.	145
Figure III.11 : Hybridation des filtres avec les ADNc soustraits utilisés obtenus lors de la construction des banques SSH. Les signaux produits après hybridation révèlent une fixation préférentielle des ADNc soustraits sur les clones de la banque correspondante. A) Filtre de type SSHr hybridé avec une cible issue des ADNc de la SSHbp, B) Filtre de type SSHr hybridé avec une cible issue des ADNc de la SSHr.	145
Figure III.12 : Valeurs brutes des bruits de fond en fonction du filtre. L'exemple est pris ici sur les quatre filtres de type SSHbp hybridés avec les quatre répétitions de cible BP. Les flèches indiquent deux points aberrants.	146
Figure III.13 : Moyenne par filtre des logarithmes népériens des valeurs brutes des bruits de fond (Ln(Bkgd)) en fonction de la moyenne par filtre des logarithmes népériens des valeurs brutes des témoins (Ln(Brut)).	147
Figure III.14 : Moyenne par filtre des logarithmes népériens des valeurs brutes des bruits de fond (Ln(Bkgd)) en fonction de la moyenne par filtre des valeurs corrigées des témoins (Ln(Soustrait)).	148
Figure III.15 : Exponentielles des moyennes des valeurs corrigées de l'actine (Ln(Soustrait)) par concentration en fonction de la valeur de dilution. Cette relation est linéaire de type « $Y = a \cdot X + b$ » avec $b = 1$ et $a = 0.8$	148
Figure III.16 : Test des 37 couples d'amorces à partir d'ADNc de BP et B.	149
Figure III.17 : Distribution des données PCR obtenues pour le clone CA-S01_009_E01 (intensité du signal corrigée du bruit de fond en fonction du nombre de cycles PCR). Pour chaque variété (BP en bleu et BR en rouge) une régression ajustée a été effectuée. La projection de l'intersection des courbes avec la droite $Y=M/2$ sur l'axe des abscisses donne les deux valeurs de b.	154
Figure III.18 : Différentiels d'expression visibles, entre BP et BR, sur gel d'agarose, pour les dix clones EST retenus ainsi que le témoin Ubiquitine	154
Figure III.19 : Northern Blot effectué en utilisant comme sonde le gène du clone CA-S02_008_F08	156
Figure III.20 : Northern Blot effectué en utilisant comme sonde le gène du clone CA-S02_005_F10	156
Figure III.21 : Northern Blot effectué en utilisant comme sonde le gène du clone CA-S02_003_E08	156
Figure III.22 : Northern Blot effectué en utilisant comme sonde le gène du clone CA-S01_009_E01	156

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Tableau I.1 : Classification des caféiers d'après Leroy (1980) et Bridson (1987)	18
Tableau I.2 : Origine possible des différents mutants présentant des variations de niveau de ploïdie	31
Tableau I.3 : Principaux caractères affectés dans quelques mutations de l'espèce <i>C. arabica</i> L par rapport au groupe des Typica (Krug, 1949)	32
Tableau I.4 : Déterminisme génétique de quelques mutations de l'espèce <i>C. arabica</i> L par rapport au groupe des Typica (Krug et Carvalho, 1951)	32
Tableau I.5 : Classification et caractéristiques générales des mutations	40
Tableau I.6 : Type de chimères possibles : trois périclines, cinq mériclines et une sectorielle.	49
Tableau I.7 : Quelques exemples d'identification de loci pour des gènes impliqués dans la maturation, le développement ou la qualité des fruits charnus par une approche gène-candidat.	58

CHAPITRE II

Tableau II.1 : Annotations dans le texte pour les observations	86
Tableau II.2 : Principales caractéristiques de la partie de l'apex composé du méristème apical et des nouvelles feuilles en formation, à différentes étapes du développement.	91
Tableau II.3 : Résultats de des ANOVA a deux facteurs concernant les dimensions prises sur l'apex. Les facteurs sont la variété et la phase de développement.	92
Tableau II.4 : Rapport « Bourbon pointu/Bourbon » pour les dimensions des apex durant son développement.	93
Tableau II.5 : Résultats des ANOVA a deux facteurs concernant les longueurs d'entre-nœud du Bourbon pointu (BP) et le Bourbon (B) chez de jeunes plants âgés de cinq mois, à Montpellier et à La réunion.	94
Tableau II.6 : Résultat de l'ANOVA à un facteur sur la taille des plants (Pl_H) et les longueurs d'entre-noeud (K_L et K-2_L) chez Bourbon (B) et Bourbon pointu (BP) âgés de 18 mois. Tous les caractères montrent des différences significatives.	95
Tableau II.7 : Résultats des ANOVA à deux facteurs concernant la hauteur des cellules (Cell_Ht), leur largeur (Cell_larg) et l'indice de forme cellulaire (Cell_form) chez le Bourbon et le Bourbon pointu.	95
Tableau II.8 : Caractéristiques cellulaires chez le Bourbon et le Bourbon pointu à quatre emplacements de l'axe orthotrope.	95
Tableau II.9 : Résultats des ANOVA à un facteur concernant le nombre de cellules en largeur et en hauteur dans le moelle des emplacement L1 et L3 chez les variétés Bourbon et Bourbon pointu. Toutes les analyses montrent des différences significatives.	96
Tableau II.10 : Analyse de la variance d'un modèle équilibré à deux facteurs fixes avec interaction : variété et traitement.	99
Tableau II.11 : Moyennes des longueurs d'entre-nœuds observées chez les deux variétés au temps T0	99
Tableau II.12 : Analyse de la variance d'un modèle équilibré à deux facteurs fixes avec interaction : variété et traitement.	99
Tableau II.13 : Analyse de la variance d'un modèle déséquilibré à deux facteurs fixes avec interaction : variété et traitement	100

CHAPITRE III

Tableau III.1 : Liste des clones retenus comme sondes pour la construction des <i>macro-arrays</i>	133
Tableau III.2 : Classification des ESTs selon leur différence par rapport au signal corrigé des témoins négatifs.	138
Tableau III.3 : Valeurs prises à partir de 1152 gènes séquencés dans chacune des deux banques SSHbp (Banque soustractive spécifique du Bourbon pointu soustraite par le Bourbon) et SSHb (Banque soustractive spécifique du Bourbon soustraite par le Bourbon pointu).	144
Tableau III.4 : Comparaison 2 à 2 des coefficients de corrélation obtenus à partir des signaux normalisés de trois filtres indépendants (f2, f4, f6) hybridées avec la même cible (Bourbon)	147
Tableau III.5 : Résultats des ANOVA à modèle hiérarchisé et fixe par type de filtre sur les valeurs Ln(Soustrait) de 100 bruits de fond pris au hasard sur les filtres.	148
Tableau III.6 : Moyenne des Ln(Soustrait) de l'actine en fonction des concentrations. Les lettres en exposant représentent le résultat du classement des moyennes selon le test de Tukey. La solution-mère C0 a été diluée de moitié afin d'obtenir la solution C1, à partir de laquelle la solution C2 a été obtenue (dilution 1/2). Cette dernière a servi de solution-mère à la solution C3 (dilution 1/2).	150
Tableau III.7 : Moyenne des valeurs corrigées (Ln(Soustrait)) de l'ubiquitine en fonction des concentrations. Les lettres en exposant représentent le résultat du classement des moyennes selon le test de Tukey.	150
Tableau III.8 : Carrés moyens résiduels (C _{Mr}) des analyses de variance à un facteur (sur la nature du témoin positif). Exemple pris pour les cibles B et des filtres BP ou B.	151
Tableau III.9 : Valeurs des écarts à la moyenne par cible (BP : cible de type pointu, B : cible de type rond) et par filtre (Filtre BP et B). Les Ln(Soustrait) sont soustraits de la valeur moyenne du tube dans lequel il était (dernière ligne).	152
Tableau III.10 : Effectifs observés pour les quatre classes déterminées par le test de Dunnet.	152
Tableau III.11 : Les trois ESTs de la SSHbp présentant une incohérence : présents dans la classe 3, mais montrant des ratios d'expression « BP/B » inférieurs à 1. Moy C _{bp} (respectivement C _b) : moyenne pour la cible de type BP (respectivement B). Dunnet C _{bp} (respectivement C _B) : valeur du test de Dunnet pour la comparaison de la moyenne C _{bp} (respectivement C _b) avec les témoins négatifs.	153
Tableau III.12 : Séquences des amorces utilisées pour amplifier les dix clones sélectionnés et le témoin (l'Ubiquitine). L : première amorce, R : seconde amorce.	155
Tableau III.13 : Résultats des ANOVA pour les dix clones sélectionnés et le témoin puis comparaison avec les résultats précédents de <i>macro-arrays</i> . « No hit » : pas d'homologie de séquence avec les bases de données.	157
Tableau III.14 : Comparaison des ratios « BP/B » (ratio des intensités d'expression entre les deux variétés) obtenus lors des analyses par RT-PCR (en phase exponentielle) et par <i>macro-arrays</i> , pour les dix gènes sélectionnés et le témoin.	157
Tableau III.15 : Sources de variations dans les expérimentations sur puces à ADN. D'après Schuchhardt <i>et al</i> , 2000 et Wildsmith et Elcock, 2000	162
Tableau III.15 : ESTs dont le différentiel d'expression est similaire entre la technique SSH et la technique <i>macro-array</i> couplée à la vérification en RT-semi quantitative.	169

Introduction générale

L'épopée du berger Kaldi, relatée dans un des contes des "Mille et Une Nuits", reste certainement la plus fameuse des histoires relatives au café. Alors qu'il faisait paître ses chèvres dans les montagnes d'Arabie, Kaldi découvre des arbustes couverts de petits fruits rouges. Ayant remarqué l'excitation qui s'emparait de ses bêtes après avoir brouté sur les collines, le berger choisit d'en parler aux "moines" soufis (ascètes musulmans) présents dans la région. Ces derniers décidèrent d'aller cueillir ces fruits, les firent sécher et préparèrent une infusion qu'ils burent avec délice. Bientôt, ils furent gagnés par une agitation fébrile qu'ils assimilèrent à une révélation divine. (Les Mille et Une Nuits, contes traduits par Jamel Eddine Bencheikh et André Miquel, Gallimard, La Pléiade (3 vol), 2005)

Les vertus stimulantes du café auraient été découvertes, il y a très longtemps, sur les collines du Yémen grâce à la curiosité d'un berger intrigué par l'état d'agitation de ses bêtes après qu'elles aient brouté les feuilles et les fruits d'arbustes environnants. Un religieux, consulté, expérimenta ensuite les effets bénéfiques du breuvage obtenu à partir des graines grillées. Il établit plus tard que ces arbres avaient été introduits au Yémen par des peuples venus d'Abyssinie. Jusqu'au XVII^e siècle, le café est utilisé essentiellement dans les pays orientaux pour ses vertus médicinales de stimulation physique et intellectuelle. L'élargissement progressif de sa consommation aux grandes villes européennes, pendant le siècle des lumières (XVIII^e siècle), permettra la vulgarisation de son usage à travers les « maisons de café ». Ce qui lui donnera son statut définitif de boisson.

Le café est aujourd'hui avec le pétrole, le blé, le sucre et la pâte à papier un des principaux produits du commerce mondial. Deux espèces, avec des qualités organoleptiques distinctes, se sont répandues et sont principalement cultivées parmi l'extrême diversité des taxons connus. D'une part, l'espèce *Coffea arabica*, à l'origine d'un café doux et aromatique préféré des consommateurs (68% de la production mondiale), qui pousse principalement dans les régions d'altitude d'Afrique et d'Amérique latine, et d'autre part *C. canephora*, caractérisée par une boisson plus forte et amère, et qui est adaptée aux régions intertropicales humides de basse altitude d'Afrique, d'Amérique et d'Asie. Tandis que les variétés d'Arabica sont reconnues pour leurs bonnes caractéristiques de production et de qualité, l'espèce *C. canephora*, désigné sous l'appellation Robusta du nom de sa variété la plus répandue est connue pour sa robustesse agronomique.

L'expansion du caféier Arabica à travers le monde a été faite à partir de deux sources différentes du Yémen : les Typica, issue d'une plante provenant du jardin botanique d'Amsterdam, et les Bourbon, originaire de l'île de la Réunion. C'est dans cette île, au début du XIX^e siècle qu'a été sélectionné un arbre reconnaissable par son port très particulier au sein d'une plantation de café Bourbon. D'un point de vue morphologique, elle se caractérise, entre autre, par un port pyramidal et la forme pointue de ses grains. Cette nouvelle variété fut appelée variété Leroy, Bourbon pointu ou encore Laurina (du nom de la mutation spontanée dont elle provient). C'est sous ces noms qu'elle sera diffusée dans le monde. Reconnue au départ pour ses qualités de résistance à la sécheresse, elle a très vite été appréciée pour ses qualités organoleptiques. En particulier, elle est nettement moins riche en caféine (0,7% contre 1,2% chez l'Arabica traditionnel et 2,5% chez le Robusta). Malgré son excellente qualité à la tasse, la variété Laurina n'a pas été grandement commercialisée en raison de son

rendement moindre (31 % de moins que la variété Mundo Novo par exemple), mais aussi de sa fragilité vis-à-vis de la rouille du caféier.

Si dans un contexte de productivité, la variété Bourbon pointu ne rivalise pas avec des variétés mondialement réputées, dérivées de Bourbon (Caturra/Catuai d'Amérique centrale et Colombie) ou de Typica (Mundo Novo cultivée au Brésil), dans un contexte de café « haut de gamme », les qualités organoleptiques de la variété, associées à son historique, constituent à l'île de la Réunion une base commerciale pour le développement d'une caféiculture dans une situation de main-d'œuvre au coût élevé. La relance de la culture de café représente aussi un moyen de la Région Réunion d'assurer le maintien d'un tissu social dans des zones rurales anciennement dédiées à la culture du géranium pour les parfums.

Ma thèse intervient dans un projet d'appui au développement d'une filière de café haut de gamme à l'île de la Réunion, basée sur la variété Bourbon pointu. Ce projet d'appui-expérimentation se fait en collaboration avec le CIRAD et l'Université de la Réunion et est actuellement financée par La Région Réunion, la CEE et l'IRD. Dans ce projet de thèse, il s'agit de caractériser la mutation *Laurina*. D'essayer de comprendre comment une mutation ponctuelle peut avoir des effets pléiotropiques à tous les niveaux de la plante : architecture et taille de l'arbre, forme et composition biochimique des grains... Par quelles voies cette mutation agit-elle ? Quels sont les gènes touchés directement ou indirectement ? Cette mutation touche-t-elle un gène (ou une série de gènes) de régulation?... De nombreuses questions sont ainsi soulevées. Mon objectif a été d'en chercher des éléments de réponse. Pour les présenter, ce document est construit autour de quatre grands chapitres :

- Le chapitre I est une revue bibliographique subdivisée en cinq parties. Après une vision générale du genre (*Coffea*) (Partie I) et de l'espèce (l'Arabica) (Partie II), la variété étudiée (Bourbon pointu) et son historique, lié à celui du café à l'île de la Réunion, sera présentée (Partie III). Les mutations naturelles de *C. arabica* sont nombreuses, mais chacune possède des particularités qui seront exposés dans la partie IV, avec un accent mis sur la mutation *Laurina*. Enfin la dernière partie présente les différentes méthodes pour caractériser les mutants naturels (Partie V). Face à l'impossibilité de caractériser la mutation *Laurina* au niveau moléculaire (impossibilité dans les temps impartis à la thèse d'obtenir une carte saturée liée à une absence de polymorphisme génétique), nous avons décidé de caractériser les effets de la mutation *Laurina* à deux niveaux :

- Caractérisation des effets de la mutation au niveau du phénotype (Chapitre II). Comment expliquer la forme en « sapin de Noël » et les entre-nœuds plus courts du Bourbon pointu ? Quatre parties vont apporter des éléments de réponses :

- 1) Partie I. L'étude du cycle d'émergence des feuilles chez le Bourbon, au niveau macroscopique et cellulaire, et la comparaison de ces paramètres avec ceux du Bourbon pointu ;
- 2) Partie II : L'étude des effets de la mutation *Laurina* sur la croissance de la tige, en terme de division et d'élongation cellulaire ;
- 3) Partie III : L'analyse des modifications induites par la mutation aboutissant à un port pyramidal ;
- 4) Partie IV : Les effets d'application de gibbérelline exogène sur des plants de Bourbon et Bourbon pointu pour vérifier l'hypothèse d'implication de ces hormones dans l'action de la mutation *Laurina*.

- Caractérisation des effets de la mutation au niveau du transcriptome. La mutation *Laurina* modifie de nombreux aspects du Bourbon. Les objectifs de cette partie sont de comprendre quels gènes ont leur expression modifiée, et si des gènes (ou des série de gènes) de régulation sont touchés. Les techniques de la SSH (*Hybridation Suppressive Soustractive*) couplée à une étape de tri à haut débit (macro-array) ont permis la recherche de gènes différentiellement exprimés entre Bourbon pointu et Bourbon.

- Enfin, le quatrième et dernier chapitre est consacré à la conclusion générale des résultats ainsi qu'à la présentation des perspectives de ces travaux.

Chapitre I

Synthèse bibliographique

« Découvert par hasard, utilisé par piété, répandu par politique. Vin de l'Islam, opium de l'Europe, pénétrant dans chaque pays d'une façon singulièrement accordé à ses dons (butin de guerre à Vienne, mode à Paris, remède à Londres), réjouissant les gourmets, réveillant les dormeurs, inspirant les poètes et bouleversant les économistes, le café semble avoir nourri toutes les forces qui aboutissent au monde moderne » (H.E. Jacob, L'épopée du café, Paris 1953)

Tableau I.1 : Classification des caféiers d'après Leroy (1980) et Bridson (1987)

	Genre COFFEA	Genre PSILANTHUS
	Anthères et stigmates exserts	Anthères et stigmantes
	Styles longs	inserts
		Styles courts
Fleurs axillaires	s/genre <i>Coffea</i>	s/genre <i>Psilanthus</i>
Développement monopodial	(plus de 80 taxons)	(1 taxon)
Fleurs terminales	s/genre <i>Baracoffea</i>	s/genre <i>Afrocoffea</i>
Développement sympodial prédominant	(7 taxons)	(20 taxons)

I Les caféiers

Cette partie résume les connaissances sur la taxonomie, la morphologie, le mode de reproduction et la structure du génome propre aux caféiers. Nous nous intéresserons plus particulièrement à l'espèce cultivée *C. arabica* Linné et à son mutant *C. arabica* L. var Laurina.

I.1 Taxonomie botanique

Les caféiers au sens large appartiennent à la famille des Rubiacées particulièrement répandue dans les pays tropicaux. Classés dans la tribu des *Coffeae*, ce sont des arbres ou arbustes portant des fleurs odorantes. Les ovaires possèdent deux loges avec chacune un ovule. Les graines présentent un sillon ventral plus ou moins invaginé, signe distinctif de leur placentation originale, dite « cofféenne » (Leroy, 1980). Cette tribu est subdivisée en deux genres - *Coffea* L. et *Psilanthus* Hook.f (Bridson, 1986 ; Bridson et Verdcourt, 1988) - se distinguant par leur structure florale particulière – et eux mêmes subdivisés en deux sous-genres (*Coffea* et *Baracoffea* pour le genre *Coffea* ; *Psilanthus* et *Afrocoffea* pour le genre *Psilanthus*) (Tableau I.1).

Le genre *Coffea*, créé par Linné en 1735, a subi des aménagements successifs, toujours discutés aujourd'hui (Leroy, 1980, Bridson, 1986, Bridson et Verdcourt, 1988 ; Davis *et al.*, 2005). Au sens strict, le terme de caféiers est réservé au sous-genre *Coffea*, caractérisé par des inflorescences exclusivement axillaires et une croissance monopodiale. Il regroupe plus de 80 taxons, dont l'aire de répartition naturelle tropicale s'étend de l'Afrique de l'ouest à Madagascar et aux îles Mascareignes.

I.2 Structure génétique

La structure génétique des caféiers comprend plusieurs aspects qui sont :

Le nombre chromosomique et le caryogramme. La première description des chromosomes du caféier, faite par Bouharmont (1959), a mis en évidence l'existence d'un génome de base composé de onze chromosomes de petite taille. Au niveau structural, ils sont difficilement identifiables en microscopie optique avec néanmoins quatre chromosomes légèrement plus grands (Bouharmont, 1963).

➤ Le niveau de ploïdie. Deux niveaux de ploïdie ont été dénombrés dans les populations naturelles prospectées : le niveau diploïde ($2n = 2x = 22$ chromosomes) qui caractérise toutes les espèces (Sybenga, 1960 ; Charrier, 1976 ; Louarn, 1992), sauf *C. arabica* L., qui est

Tableau I.1 : Classification des caféiers d'après Leroy (1980) et Bridson (1987)

	Genre COFFEA	Genre PSILANTHUS
	Anthères et stigmates exserts	Anthères et stigmantes
	Styles longs	inserts
		Styles courts
Fleurs axillaires	s/genre <i>Coffea</i>	s/genre <i>Psilanthus</i>
Développement monopodial	(plus de 80 taxons)	(1 taxon)
Fleurs terminales	s/genre <i>Baracoffea</i>	s/genre <i>Afrocoffea</i>
Développement sympodial prédominant	(7 taxons)	(20 taxons)

tétraploïde avec $2n = 4x = 44$ chromosomes.

➤ Les relations génétiques en croisement. La stérilité des hybrides F1 est variable selon les croisements et est principalement d'origine chromosomique, au moins pour la fertilité mâle (Louarn, 1992). Deux grands groupes d'espèces peuvent être définis parmi les caféiers du continent africain : celui des caféiers d'Afrique de l'Ouest et Centrale et celui des caféiers d'Afrique de l'Est, sauf *C.eugenioides* et *C.arabica*. La fertilité pollinique est $> 32\%$ à l'intérieur des groupes et $< 18\%$ entre groupes. Enfin, l'espèce *C. eugenioides* s'isole de ces deux groupes (Louarn, 1992). Les caféiers de Madagascar, des Comores et des îles Mascareignes forment un groupe à part, très homogène (fertilité pollinique des hybrides F1 supérieure à 64%). En revanche, la fertilité pollinique de leurs hybrides avec *C. canephora* (groupe de l'Afrique de l'Ouest et centrale) est très faible ($< 8\%$) (Charrier, 1976).

➤ La phylogénie. Les deux genres *Coffea* and *Psilanthus* ont été la cible de nombreuses études phylogénétiques, utilisant différentes techniques. Ces dernières incluent des analyses morphologiques (Stoffelen, 1998 ; Davis *et al.*, 2005), l'utilisation de marqueurs RAPD(*random amplified polymorphic DNA*) (Lashermes *et al.*, 1993), l'étude de l'ADN chloroplastiques (Cros, 1994 ; Cros *et al.*, 1998 ; Lashermes *et al.*, 1996) ou d'ITS2 (*Internal Transcribed Spacer 2*) (Lashermes *et al.*, 1997). La différenciation des caféiers à partir de l'ancêtre commun conduirait en fait à quatre groupes de caféiers : 1) Afrique de l'Ouest et du Centre (WC), 2) Afrique du centre (C), 3) Afrique de l'Est (E) et 4) Madagascar (M) (figure I.1). Cette évolution serait récente et faite de façon radiative. Ces résultats confirment la présence d'un génome de base mise en évidence lors des relations en croisements. Enfin, les auteurs mentionnent qu'il n'y a pas lieu de séparer les genres *Coffea* L. et *Psilanthus hook.f* ; la divergence entre espèces au sein du genre *Coffea* étant plus importante (39% entre *C. racemosa* et *C. sakaraha*) que celle notée entre les deux genres : 24% entre *Coffea* et *P. manni*.

➤ La taille du génome. La quantité d'ADN nucléaire chez les espèces diploïdes est comprise entre 1,04 et 1,76 pg respectivement chez *C. racemosa* et *C. humilis* pour un même nombre chromosomique (Noirot *et al.*, 2003). Ainsi, les plus petits génomes ont une taille comparable à celle du riz ($2C = 1\text{pg}$; Bennett et Leitch, 1995). Les espèces originaires d'Afrique de l'Est ont globalement une quantité moins importante d'ADN que celles issues de la région Ouest (Cros *et al.*, 1995). Ce gradient a été confirmé sur un grand nombre d'échantillon par Noirot *et al.* (2003). Enfin, l'espèce *C. arabica*, avec 44 chromosomes, présente 2,61pg d'ADN par noyau (Cros *et al.*, 1995).

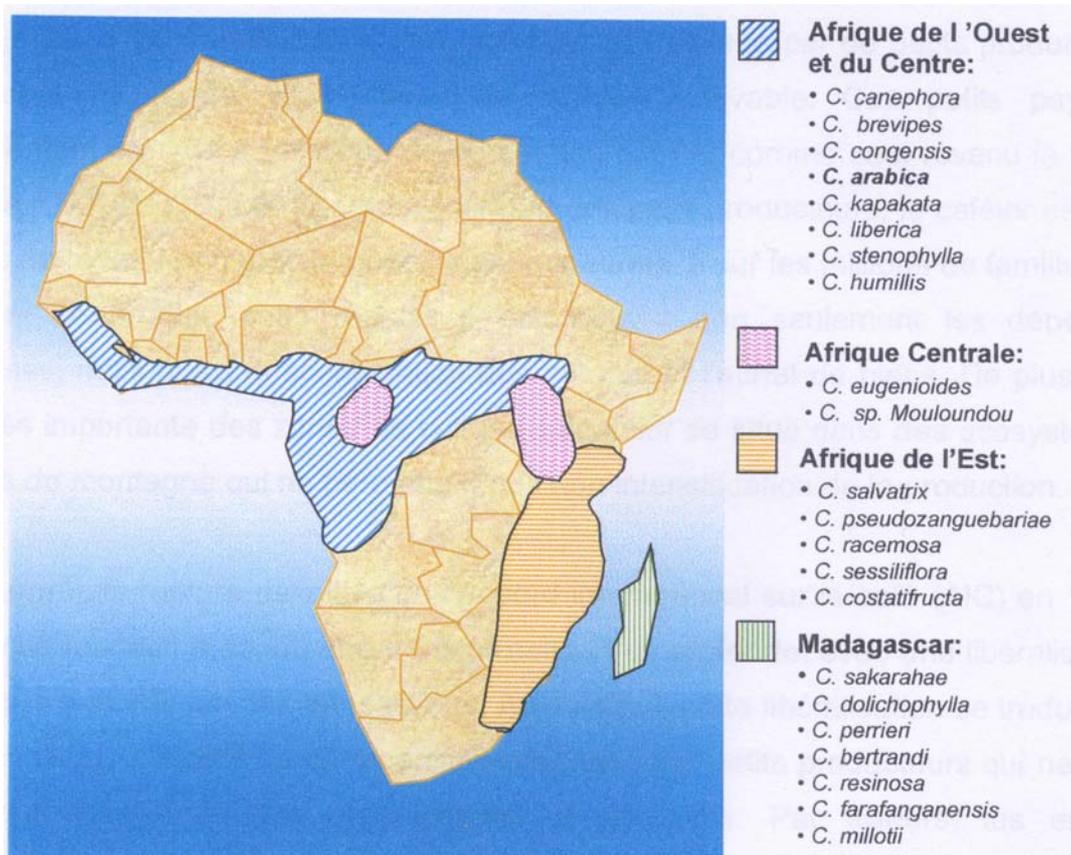


Figure I.1 : Distribution géographique des groupes phylogénétiques établis par l'analyse de séquences ITS2 de l'ADN ribosomique de 37 taxons de caféiers (Lashermes *et al.*, 1997).

I.3 Mode de reproduction

Deux grands modes de reproduction existent chez les caféiers : l'autogamie préférentielle et l'allogamie.

Trois espèces sont actuellement connues pour se reproduire par autogamie préférentielle : *C. arabica*, *C. heterocalyx* et *C. sp* Moloundou (cette dernière espèce est en cours de description botanique sous le nom de *C. anthonii*). Chez *C. arabica*, le taux d'allofécondation résiduelle est de 5 à 15% (Carvalho *et al.*, 1991).

Toutes les autres espèces sont allogames stricte (Krug et Carvalho, 1951) et l'allogamie y est d'origine gamétophytique (Devreux *et al.*, 1959) et contrôlée par un locus S multi-allélique (Berthaud, 1980 ; Lashermes *et al.*, 1996a).

I.4 Caractéristiques morphologiques, phénologiques et physiologiques

Le caféier *sensu stricto* présente une architecture classée dans le modèle de Roux (Hallé, 1970). Le tronc est monopodial et orthotrope sur lequel se branchent, à partir de six mois à un an, à chaque nœud du tronc deux rameaux plagiotropes opposés semblables, à ramification sylleptique (sans dormance). Ces rameaux plagiotropes primaires ne peuvent pas être remplacés et cela quel que soit l'âge de l'arbuste. Chacun possède à chaque nœud des méristèmes axillaires de deux natures différentes (Moens, 1962 ; Costes, 1989) évoluant soit en rameaux plagiotropes secondaires, soit en boutons floraux. Les rameaux « secondaires » peuvent à leur tour, chez certaines espèces et dans certaines conditions, donner des plagiotropes tertiaires (Figure I.2). La hauteur de l'axe orthotrope et l'intensité de ramification caractérisent les espèces. Enfin, la phyllotaxie conduit à des feuilles opposées deux à deux et décussées. Elles sont de plus persistantes (excepté en saison sèche pour *C. racemosa*).

Les inflorescences sont uniflores (*C. sakaraha*) à pluriflores (*C. canephora*, *C. arabica*, *C. liberica*) et portent des fleurs de quatre (*C. vatovavyensis*) à sept lobes (*C. farafanganensis*) (Charrier, 1976). Les bourgeons floraux apparaissent après une période sèche plus ou moins importante selon les espèces et se développent en fleurs quatre (*C. vatovavyensis*) à 14 jours (*C. richardii*) après une pluie déclenchante. La floraison dure 24 à 48 h. Quand à la fructification, sa durée varie de dix semaines (*C. pseudozanguebariae*, *C. vianeyi*) à 13 mois (*C. canephora*) (Charrier, 1972 ; Anthony, 1992). Les fruits sont de taille et de couleur variées (vert, jaune, blanc, orange, rouge, violet, noir) selon les espèces. La drupe ou cerise montre six fractions anatomiques (figure I.3) : le grain de café proprement dit,

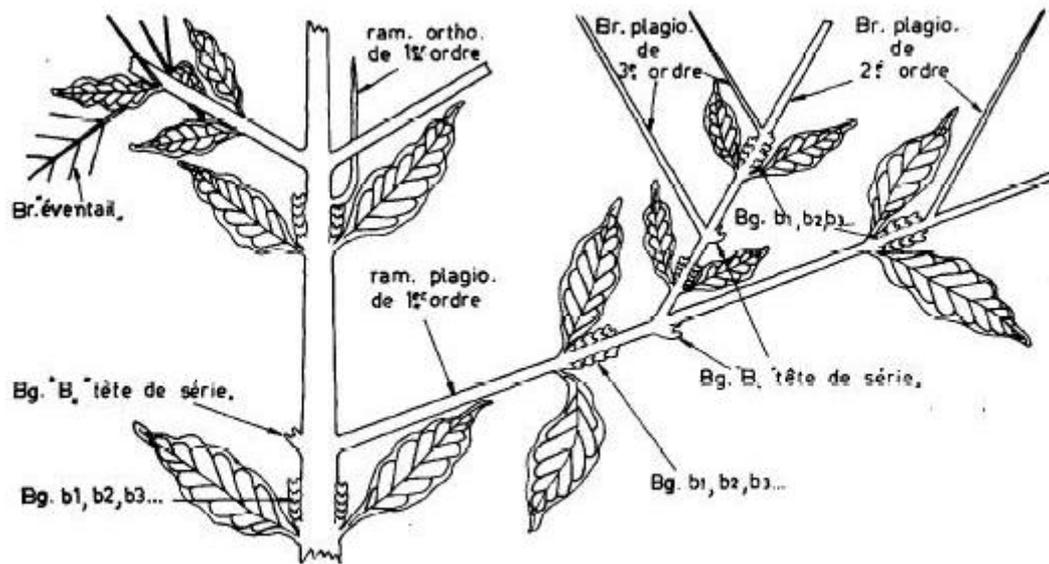


Figure I.2 : Différents parties de l'architecture d'un caféier d'après Moens (1962)

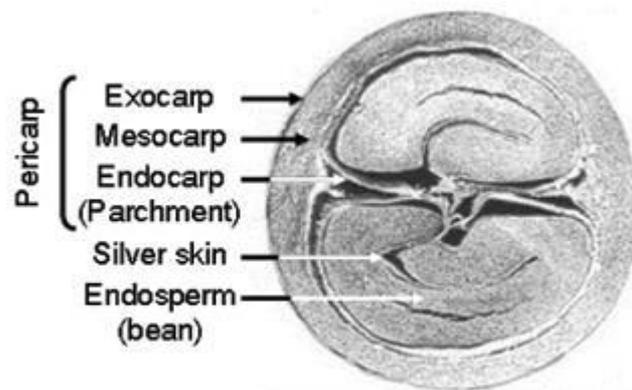


Figure I.3 : Représentation schématique des tissus présents dans le fruit de *Coffea* sp. à maturité (200 à 250 jours après fécondation) (De Castro et Marraccini, 2006)

constitué à maturité par l'albumen; une membrane argentée (spermoderme), la parche ou endocarpe; le mucilage ou mésocarpe interne, la pulpe ou mésocarpe externe, et la peau ou exocarpe (Bytof *et al.* 2000).

Les données physio-biochimiques concernent principalement le grain et les principales composantes connues pour intervenir positivement (sucres, lipides, acides aminées) ou négativement (caféine, acides chlorogéniques, mozambioside, mascarosides) sur la qualité à la tasse. Pour tous ces composés, il existe une forte variation intra- et interspécifique. La plus connue, la caféine a une teneur moyenne comprise entre 0 (*C. pseudozanguebariae*, *C. perrieri*, *C. humblotiana*, etc.) et 2,6% MS (*C. canephora*) (Campa *et al.*, 2005).

II Origine et évolution de *C. arabica*

*II.1 Structure du génome et hypothèses sur l'origine de *C. arabica**

L'origine amphidiploïde de *C. arabica* a été suggérée d'après le comportement méiotique des hybrides interspécifiques entre cette espèce et *C. canephora* (Krug et Mendes, 1940 ; Krug et Mendes, 1943). Plus tard, l'espèce *C. eugenioides* a été proposée comme parent maternel à la suite d'analyses RFLP de l'ADN mitochondrial et chloroplastique (Berthou *et al.*, 1980, Berthou *et al.*, 1983). Plus récemment, des analyses RFLP utilisant des sondes spécifiques de locus et par hybridation génomique *in situ* ont confirmé la présence de deux lots de chromosomes différents au sein de *C. arabica* (Lashermes *et al.*, 2000a ; Raina, 1998). Les deux sous-génomes ont été dénommés E^a et C^a, et proviendraient respectivement de formes ancestrales des espèces actuelles *C. eugenioides* et *C. canephora* (Lashermes *et al.*, 1999 ; Lashermes *et al.*, 2000a). D'après cet auteur, *C. arabica* proviendrait d'une hybridation entre deux formes ancestrales faisant intervenir des gamètes non réduits (2n) dont la formation aurait été favorisée par des conditions climatiques particulières. La polyploïdisation aurait pu avoir lieu après la formation d'un hybride interspécifique diploïde. Dans les deux cas, des forces sélectives auraient permis l'apparition de descendants hybrides tétraploïdes déployant une auto-fertilité importante et une méiose plus ou moins régulière (Figure I.4). Enfin, l'existence de l'autogamie dans le clade phylogénétique de *C. eugenioides* est à mentionner, bien que l'aire de distribution actuelle de *C. heterocalyx* et *C. sp* Moloundou couvre la frontière entre le Congo Brazzaville et le Cameroun. Une quatrième espèce du même clade, non encore prospectée, peut exister, ou avoir existé dans l'Est du bassin du Congo et présenter la teneur en caféine de *C. eugenioides* ou *C. sp* Moloundou (0.5-0.55% MS), l'autogamie de *C. heterocalyx* et *C. sp* Moloundou, la forte granulométrie de

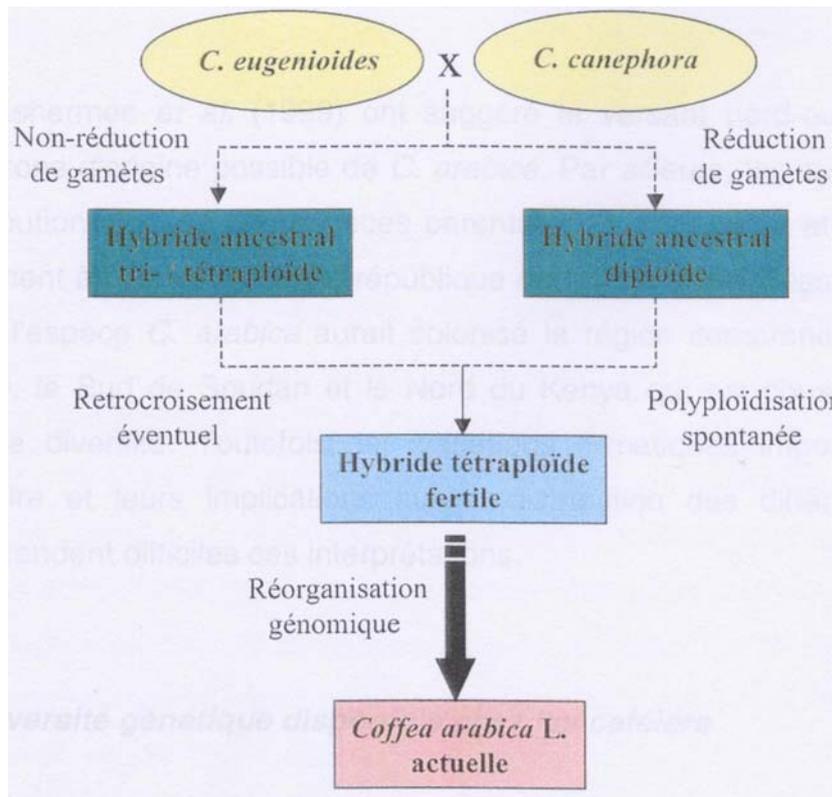


Figure I.4 : Schéma illustrant l'origine de *C. arabica* L (tiré de Herrera, 2003).

C. heterocalyx et la présence de sépales persistants sur le fruit comme chez *C. heterocalyx* et présents aussi chez quelques accessions éthiopiennes d'Arabica.

Malgré la faible différenciation de ses deux sous-génomes, *C. arabica* a un comportement méiotique de type disomique. Lors de la méiose, les appariements entre chromosomes homologues sont toujours favorisés. L'existence d'un mécanisme génétique contrôlant l'appariement sélectif entre chromosomes appartenant à un même sous-génome chez *C. arabica* a été suggérée (Lashermes *et al.*, 2000a). Ce mécanisme génétique, comparable à celui découvert chez les céréales (Riley, 1960 ; Feldman, 1993), se serait mis en place au cours du processus de spéciation.

II.2 Les deux bases génétiques majeures cultivées : Typica et Bourbon

La culture du caféier Arabica aurait commencé, au plus tard, au V^{ème} siècle dans le sud-ouest de l'Ethiopie (Lejeune, 1958). A cette époque, des caféiers ont été introduits au Yémen. Diffusés ensuite à partir de ce pays, deux bases génétiques (Typica et Bourbon) sont à l'origine de toutes les variétés actuellement cultivées. Les variétés du groupe Typica d'Amérique du sud (*C. arabica* var. *typica* Cramer ou *C. arabica* var. *arabica*) descendraient d'un seul plant introduit dans le jardin botanique d'Amsterdam en 1706 (Carvalho, 1946). Les variétés du groupe Bourbon (*C. arabica* var. *bourbon* (B.Rodr.) Choussy) proviendraient de caféiers introduits à partir de Mocha (Yemen) à l'île de la Réunion (anciennement appelée île Bourbon) en 1715 et 1718 (Anthony *et al.*, 2002a ; Haarer, 1946).

D'après Krug (1949), un gène mendélien différencierait les deux groupes. Les cultivars d'Arabica Typica seraient de génotype TT, « T » étant l'allèle dominant, alors que ceux d'Arabica Bourbon ont l'allèle récessif t et sont donc de formule génétique tt. Les cultivars dérivés du Bourbon sont caractérisés par un port plus compact et plus dressé, un plus grand rendement et une meilleure qualité à la tasse que ceux dérivant des Typica (Carvalho *et al.*, 1969).

Dans l'étude d'Anthony *et al.* (2002a), la diversité génétique de 26 variétés de *C. arabica* est évaluée par marqueurs moléculaires. Cette dernière est très faible entre les variétés dérivées du Bourbon et celles issues du Typica, mais elles sont nettement séparées. Sur 107 marqueurs AFLP détectés, 59 sont présents chez les Bourbons dont 14 polymorphes alors que chez les Typica, ces nombres sont respectivement de 55 et 5. Parmi ces cinq marqueurs, seuls trois sont absents chez les Bourbons. La distance de Nei entre les Bourbon et Typica est faible (0,17 en moyenne). Seuls sept marqueurs AFLP et deux allèles SSR

permettent de différencier les deux groupes. Cette faible diversité est la conséquence des cycles de sélection intensive des variétés, favorisés par la prédominance de l'autogamie de l'espèce *C. arabica*, mais aussi par l'histoire de la dissémination du café et de l'espèce à travers le monde.

Les premiers pieds introduits dans un pays (en rares exemplaires) étaient comme tout Arabica fortement homozygotes. Ceci explique l'existence d'une forme typique très homogène, propre à chacune de ces introductions. Le caféier *Nacional du Brésil*, le caféier *Doux de Colombie*, le *Haïti*, l'*Arabica de java*, le *Bourbon rond de la Réunion*, le *Fin vert à grosses fèves* de la Guadeloupe, constituent bien autant de populations types adaptées à chaque terroir et ayant acquis des caractères propres et des qualités qui font leur renommée.

III Histoire du café à la Réunion et plus particulièrement du Bourbon¹

III.1 Introduction du café

L'épopée du café dans les colonies françaises au XVIII^{ème} siècle est déterminée par un choix de la puissance maritime secondaire qu'est la France. Puisqu'elle ne parvient pas à reconquérir les pays producteurs des « denrées des Indes » qui ont tant fait rêver l'Europe, à l'instar des Pays-bas (tenant le monopole de la girofle et de la muscade aux Moluques) ou de la Grande Bretagne (s'implantant de plus en plus fortement aux Indes), elle occupe des terres que personne ne revendique (comme Bourbon –actuellement la Réunion-) et y importe, par persuasion ou par ruse, des plantes à forte valeur ajoutée. La France s'épargne ainsi les frais de conquête ou les redevances aux intermédiaires, puisqu'elle est à la fois productrice et importatrice. Mais la recette est si simple qu'elle peut-être imitée par d'autres : les cours des produits d'exportation, qu'il s'agisse du café, des épices ou plus tard de la vanille, du géranium et même de la canne à sucre (sauvée par la finance et la technique) suivront toujours une courbe en cloche caractéristique : d'abord, une forte expansion, correspondant à des cours favorables et des contraintes agronomiques réduites, puis une érosion, à mesure que la concurrence internationale se renforce et que les maladies se développent. Le phénomène n'a pas que des conséquences économiques : pour produire vite ces denrées qui se vendent bien, le système colonial fait appel massivement à l'esclavage. La multiplication du café passe donc par celle des esclaves dans les « habitations » brutalement enrichies. Le choix de l'économie

¹ Par souci de clarté, la bibliographie de cette partie provenant d'archives, les sources documentaires seront ici indiquées chronologiquement par un numéro et seront répertoriées avec le reste de la bibliographie à la fin du manuscrit.

de plantation aura des conséquences majeures sur l'histoire sociale, économique et politique de la Réunion (1).

L'expédition des bateaux nommés « Le Diligent » et « La Paix » en 1713 à Bourbon est déterminante. La question de savoir s'ils sont intéressés par la culture du café est clairement posée aux habitants de cette île. Il faut reconnaître que, dans leur ensemble, ils ne semblent pas avoir été brûlants d'enthousiasme : ils ont surtout déjà vécu deux échecs de tentative d'introduction de plantes exotiques : le giroflier en 1681 et la poivrier en 1702. De fait, ils se contentent de leurs cultures vivrières et de leurs petits trafics avec des pirates ou la Compagnie des Indes. Mais celle-ci voit enfin une possibilité sérieuse de développement de l'île (2). Pontchartrain, ministre du Roi, expédia des lettres le 31 octobre 1714 à plusieurs bateaux en partance pour Bourbon. Il notifiait en ces termes l'ordre du roi : « *Les directeurs de la compagnie des Indes ayant besoin de tirer de Moka , ... , des arbres qui produisent le café, l'intention du Roi est que vous chargiez la plus grande quantité que vous pourrez de ces arbres pour les remettre au gouverneur de l'île Bourbon qui aura soin de les faire planter et cultiver. Comme vous devez passer à la côte de Malabar, Sa Majesté désire aussi que vous y preniez des plants et arbustes qui produisent le poivre et la cannelle sauvage, (ces derniers devant servir de porte-greffe), et que vous les remettiez pareillement à ce gouverneur* » (3). Le 7 novembre 1714, Foucherole, Souillet, Tardif et Champigny signaient à l'intention du capitaine des bateaux un mémoire instructif dont en voici des extraits : « *choisir des arbres fort jeunes, les enlever en motte, les mettre dans une demi-barrique et les arroser d'eau « non salée ». Prendre aussi dix livres de café « en coque », le plus frais qu'on pourra trouver, les mettre dans une bouteille de verre ou dans une caisse enduite de goudron. Rédiger un mémoire sur la façon de cultiver le caféier. Embarquer à Calicut les poivriers et canneliers que l'agent de la compagnie Mollandin doit tenir prêts suivant les ordres qui ont dû lui en être donnés par le conseil de Pondichery depuis 1713. Remettre le tout à quelques habitants de Bourbon nommément désignés : Jacques Auber, Pierre Hibon ou André Rault* ». Suivant d'Hardancourt, ancien directeur de la Compagnie des Indes orientales, il y avait alors à Moka, où l'on devait embarquer les caféiers, un agent français du nom d'Imbert qui avait réussi à se procurer « *soixante pieds d'arbres caféiers pour les transporter à l'île Bourbon* » (6). En effet, le roi du Yémen le lui avait permis, car il était alors en bon terme avec les français qui l'avaient soigné en 1712 d'un abcès à l'oreille (7).

Le 23 septembre 1715 le navire le « Chasseur » jeta l'ancre à Saint Paul et y déposa vingt caféiers des soixante embarqués à Moka, les autres ayant péri après trois mois de

navigation. Cette mission a été acquittée par Dufresne d'Arsel. Les précieux plants furent confiés aux soins des frères Martin, habitants de Saint Denis, qui devaient les entretenir et surtout les multiplier (8). D'après Haarer (1956) uniquement deux plants des vingt débarqués ont survécu. Cette information atteste des difficultés auxquelles les premiers cultivateurs ont dû faire face lors des premières introductions.

III.2 Découverte du café indigène Mauritianus

L'introduction de caféiers de moka à la Réunion et l'idée de cultiver du café sur cette île suit la découverte d'un café indigène, vite baptisé « café marron ». Sur le chemin de leur retour en France, des navires s'arrêtent à Bourbon du 20 avril au 3 septembre 1711. D'Hardancourt met à profit cette longue escale pour s'informer de tout. Au cours d'une excursion dans les environs de Saint-Paul, il découvre un caféier indigène et en fait ramasser le plus possible pour en confectionner deux petits ballots, qu'il rapportera en France pour en connaître la qualité. « *Ce café est un peu plus gros que celui de Moka et pointu par les extrémités.* » (9). Plus tard, en 1717 ; le sieur Lacour, gouverneur de Bourbon depuis 1698 jusqu'à 1701, prétendit lui aussi avoir trouvé « *dans les bois et dans les haies des fèves ou grains de café* » dont il aurait fait l'essai (10). Ce caféier indigène, distinct de celui d'Arabie, n'a été décrit qu'en 1783, par Lamarck, sous le nom de *Coffea Mauritianus*. En 1717, la différence entre le caféier indigène et celui de Moka n'était pas encore manifeste. Certes les grains de café marron que les navires « le Chasseur » et « l'Auguste » ont rapportés en France paraissaient plus longs, plus larges et plus gros que ceux du caféier d'Arabie, mais les officiers du *Chasseur* attribuaient cette particularité à ce que « *les terres de l'île de Bourbon sont beaucoup meilleures à celles qui donnent le café Moka* ». Il fallait donc entourer le caféier indigène de soins aussi vigilants que ceux apportés aux plants introduits d'Arabie (11).

III.3 Diffusion des plants

Quand la nouvelle de la découverte d'un caféier indigène et du succès de l'introduction de quelques plants de Moka a été apportée en France, l'indifférence de la Compagnie des Indes à l'égard de l'île Bourbon a fait place à un sentiment qui n'était pas encore de l'enthousiasme, mais qui n'était plus du dédain. A partir de 1715, la culture intensive du café contribue à la mise en valeur de la colonie (12).

Les deux derniers caféiers survivants, confiés à la sollicitude des frères Martin, ont fini par prendre racine sur « l'habitation des citronniers » située au Chaudron. Au mois de septembre 1717, ils étaient couverts de fleurs. On voyait bien alors, écrivait Justamond, qu'il

s'agissait d'une autre espèce que l'indigène car « *le bois et la feuille étaient différents* » (13) « *Des graines cueillies au début de 1718, 683 furent distribuées, 484 ne levèrent pas, et sur les 199 plants issus du reste, 82 furent encore détruits par les bêtes* » (14). Peu s'en fallut que la souche elle-même ne disparût. A la suite de circonstances inconnues, l'un des deux arbustes venus de Moka périt, peut-être au cours du violent cyclone du 1^{er} avril 1718 (15). Au milieu de cette année, les espoirs de l'île reposaient donc sur l'unique survivant, ainsi que sur les 117 jeunes plants, bien fragiles encore, sorties de la plantation du début de l'année, ainsi que sur le café indigène. Dès le 4 décembre 1715, le conseil provincial statua pour augmenter le nombre de caféier que « *chaque homme travaillant, tant blanc que noir, depuis l'âge de 15 ans jusqu'à 60* » *serait tenu d'en («du caféier indigène») cultiver cent plants qu'il irait prendre dans les bois et replacerait en terre à 5 pieds de distance les uns des autres, comme de cueillir une livre de ce café sauvage pour être remis, sec et net, au commandant de l'île « au plus tard à la Notre dame de mars* » (16) Justamond se trouvait ainsi en possession d'une petite quantité de café du cru quand, en avril-juin 1717, firent escale à Bourbon trois vaisseaux qui rentraient du pacifique en Europe : « le Jupiter », « le marquis de Mailebois » et « le Comte de Lamoignon ». Les voyageurs firent honneur au produit issu du café indigène, qu'ils trouvèrent toutefois « *moins onctueux et plus amer* » que celui de Moka (17)

Peu à peu les habitants se tournèrent néanmoins vers la culture du Moka à mesure qu'on leur fournira les semences nécessaires. Au mois de janvier 1719, le seul survivant des arbustes confiés à saint Denis à la garde des frères Martin a commencé à donner pour la seconde fois des graines mûres. Une distribution en avait été faite jusqu'en juillet, plus étendue que celle de 1718. Compte tenu des graines qui n'ont pas germé et des plants qui ont été coupés par les insectes, on s'est trouvé riche de 779 sujets. Ce qui joint aux 117 rescapés de la plantation de l'année précédente, faisait à la fin de 1719 un total de 896 rejetons (18). Un an plus on atteindra les 7000 sujets. En 1727, la production atteint 250 000 livres. Elle sera dix fois plus importante en 1744 (19).

III.4 Ere de prospérité du café

En moins de vingt ans, le café de Bourbon s'impose à Paris. La mode du café, lancée à la fin du règne de Louis XIV, a pris toute son ampleur sous Louis XV mais la denrée importée d'Arabie. La produire en terre française reste cher, mais diminue tout de même les coûts.

A l'appât du gain, les gouverneurs ajoutent le poids de la loi, le Conseil supérieur menace les réfractaires en 1724 : « *Le Conseil supérieur, au nom du roi, déclare sous séquestre les concessions sur lesquelles il n'y a pas de caféiers originaires de Moka*

rapportant des fruits (...). Toutes celles sur lesquelles il ne se trouvera pas au moins deux cent caféiers par chaque tête de Noir travailleur du propriétaire leur seront retirés (...) pour être concédées aux personnes laborieuses... » « Il nous ait aussi parvenu que quelques-uns, par la plus noire et la plus détestable malice, ayant de beaux caféiers, les auraient détruits (...). Ces malfaiteurs seront punis de mort sans aucune rémission ni égard à la qualité et conditions des personnes... » (20). Ce système de plantation obligatoire entraîne un rapide enrichissement de ceux qui sont assez fortunés et dynamiques pour en tirer profit. Cette opulence a cependant ses revers puisque désormais, et pour longtemps, Bourbon lie son sort à celui d'une monoculture.

En 1725, le nouveau gouverneur Pierre Benoist Dumas, se lance à corps perdu dans le développement de la production de caféiers. D'ores et déjà, les défauts du café produit à Bourbon sont bien connus des directeurs : *« la qualité du café créol de Moka que vous avez envoyé est bonne, mais ce café a été cueilli trop verd et a ressué pendant la traversée. N'envoyez plus désormais de café sauvage : il n'est bon à rien et pourrit dans le magasin, personne n'en voulant »* (21) La culture du café indigène est alors abandonnée et, sous l'impulsion de Dumas, la qualité s'améliore ; le comptoir de Moka envoie un mémoire sur la manière de cultiver le plant, de cueillir et de faire sécher les grains. Malgré tout, le café de Bourbon reste moins parfumé, et ne convient pas encore au goût français ; tel est le sens de la lettre adressée le 23 décembre 1730 au Conseil supérieur de Bourbon : *« l'odeur parfaite que l'on trouve au café de Moka manque encore à celui de Bourbon (...); le café que vous avez adressé cette année à la compagnie a été envoyé à Hambourg est en Hollande (...) parce que n'étant pas de la qualité requise »* (22). En 1732, la Compagnie remarque que quoique *« il manque encore quelque chose à ce café, il lui parut assez bon »* (23) Pourtant, rien n'a été négligé pour conserver et améliorer la qualité du produit : les baies sont cueillies parfaitement mûres et on fait ressuer les graines pendant un an au moins. En fait la recommandation de les faire sécher sur un sol de maçonnerie, l'utilisation fréquente d'un sol en terre battue entraîne la formation de moisissures. A la fin de 1734, la Compagnie recommande de refuser *« de recevoir comme marchand le café qui paraîtra défectueux »*, voir de le faire jeter à la mer *« après que la mauvaise qualité aura été constatée par les habitants experts »* (24). Enfin, l'importance de l'emballage a été pris en considération afin de préserver le café des avaries et lui conserver son arôme en cours de voyage : après la visite demandée par Dumas de deux emballeurs arabes en 1733, l'emballage se fait désormais sous double enveloppe : une de natte, l'autre de toile (goni), importée de Moka ou de Pondichéry.

En 1735, les efforts de et les incitations répétées de la Compagnie ont porté : la plupart des habitants de Bourbon se sont transformés en planteurs. De tous les côtés, quoique inégalement, l'île s'est recouverte de caféiers –près d'un million et demi de plants- et la « fève de Mascarin » croît et se multiplie. La production, vraisemblablement sous-évaluée du fait des méthodes de recensement et d'une contre-bande insaisissable commence enfin à répondre quantitativement aux attentes des Directeurs (25).

Si 1735 annonce bien une ère de prospérité pour l'île, à terme cependant, les désillusions furent nombreuses : Bourbon tend certes à s'affirmer comme le « Grenier des Mascareignes », mais les cultures de spéculation rencontrent de sérieux obstacles , les nouvelles espèces n'arrivent pas à s'établir, la qualité du café ne s'améliore pas exceptionnellement, et les tentatives pour trouver de nouveaux débouchés s'avèrent vaines alors qu'à partir de 1736, le café de Martinique arrive en concurrence sur le marché métropolitain.

III.5 Abandon de la culture

Croire à une monoculture totale du caféier dans la réunion du XVIII^{ème} siècle, et même l'imaginer possible est un leurre. Trop de facteurs, humains ou naturels l'interdisaient et c'est aussi leur conjonction qui explique le déclin, puis la disparition de cette économie au XIX^{ème} siècle.

Traditionnellement la responsabilité de l'effondrement du café à la Réunion est imputé surtout aux terribles catastrophes naturelles de 1806. Effectivement, ces désastres, non seulement détruisirent une grande partie des cafétérias, mais surtout provoquèrent une véritable désaffectation à leur égard : *« on n'eut pas le courage de les rétablir, écrit Billiard ; dans plusieurs cantons la terre, qui pendant de longues années avait été chargée de caféiers, refusa d'en produire de nouveaux ; dépouillée des grands arbres qui la couvraient autrefois, les jeunes plants de caféier n'étaient plus capables de lui conserver la fraîcheur ou d'attirer les pluies dont ils avaient besoin »* (26)

En 1806, l'île vient d'être débaptisée deux fois : d'abord en 1793, où elle a perdu son nom de Bourbon pour celui d'île de La Réunion (le roi venant d'être décapité) ; puis en 1806 où, elle prend le nom de l'empereur. L'île Bonaparte subit un cyclone le 19 février 1806, un de plus dans sa longue histoire. Sauf que celui-ci et ceux qui vont lui succéder en 1806 et 1807 vont marquer un véritable tournant : la sortie de l'ère du café et l'entrée dans l'ère de la canne. Comme si ce n'était pas suffisant, le 10 mars, un second ouragan frappe l'île, aussi

violemment. Les maisons ont subi une fois de plus des dégâts considérables, les récoltes du Nord-est ont durement souffert : presque tous les girofliers sont détruits, les deux tiers du maïs, la moitié du café. Même bilan dans le Sud. À St-Leu, les deux tiers du café ont été détruits et beaucoup de maisons ont été « chavirées » par le vent. Cette calamiteuse année 1806 va se conclure, en décembre par un troisième cyclone qui ne sera pas de vent, cette fois, mais de pluie. L'inondation de 1806 dépasse de 18 pouces, soit près de 50 cm l'ancien record, qui datait de 1751. Cette fois, ce ne sont pas les vents qui détruisent les cultures, mais les débordements de rivières, les ruptures de digues et surtout l'érosion à laquelle il fallait s'y attendre. Depuis presque un siècle, les colons de La Réunion avaient furieusement défriché les forêts, ces forêts qui allaient jusqu'à la mer presque partout, sauf dans les zones les plus arides. Défriché pour mettre à la place leurs cultures et surtout le café.

Deux saisons cycloniques, deux seulement pour découronner la culture maîtresse de Bourbon, pour balayer un siècle d'histoire économique ? Ce n'est pas tout à fait si simple. Bien sûr, on ne répare pas les arbres brisés par le vent : bien des caféiers, bien des girofliers sont partis en petit bois. On ne restaure pas non plus les terres qui sont parties à la mer. Car un sol dénudé, où ne poussent que les troncs maigres des caféiers, bien protégés des mauvaises herbes, c'est un sol qui va se lessiver sous les grosses pluies, qui va se raviner et va filer avec l'eau vers la mer. Quand l'île sèche enfin, au début de 1807, les dégâts sont irrémédiables dans certaines régions : plus jamais on ne pourra planter quoi que ce soit dans les champs dénudés. À moins d'y rapporter de la terre... Ce sont les cultures industrielles qui ont payé le plus dur tribut : le giroflier, dont les arbres fragiles ont mal résisté aux vents ; et le café, renversé, déraciné, anéanti aux deux tiers, dans certaines régions. Cependant, cela ne suffit pas à expliquer l'abandon brutal de cette culture qui a fait la fortune de l'île depuis 90 ans. Après tout, des cyclones, l'île en avait connu d'autres... Les vraies raisons, en fait, sont beaucoup plus profondes et ne sont pas liées aux péripéties climatiques de la petite colonie, mais aux grandes marées économiques planétaires. Disons simplement que les cyclones de 1806 et 1807 auront servi de déclencheur, ou peut-être de prétexte. En 1810, la rouille du caféier (*Hemileia vastatrix*) dévastait tout ce qui en restait. C'est dans les décennies suivantes que s'effondre la production caféière : 928 tonnes en 1836, 665 tonnes en 1845, 368 tonnes en 1865. A. Jacotot, reprenant à son compte la sempiternelle litanie locale, attribue globalement ce phénomène à l'insuffisance de la main d'œuvre. Il l'impute aussi, tout au moins pour ses débuts « à l'engouement créole », « *cet engouement qui a fait qu'à la Réunion chaque culture a eu son époque pour disparaître ensuite presque complètement devant une autre plus*

rémunératrice et que beaucoup de planteurs n'ont pas hésité à remplacer des caféiers en plein rapport par des cannes à sucre » (27). Defos du Rau décrit aussi le « grand remue-ménage » qui suivit les premiers succès dans la canne de Charles Debassyns, dans les années 1815-1817 : « *caféiers et bois noirs étaient arrachés frénétiquement et remplacés par les rubans verts de cannes, si flexibles aux cyclones* » (28). A la différence des booms passagers sur les grains du XVIII^e siècle, le triomphe du « roi sucre » était destiné à durer : en 1852, la superficie occupée par le café est à peu près dix fois moindre que celle cultivée en cannes, 2535 hectares contre 24867 ; trois ans plus tard elle ne représente même plus le vingtième, 2341 hectares contre 55189 (29). Il y avait plusieurs décennies qu'en fait, certains planteurs, parmi les plus puissants, cherchèrent d'autres ressources que le café et le girofle.

La recette de La Réunion consistait à cultiver sur son territoire une denrée à forte valeur poussant en peu d'endroits sur la planète. C'était vrai pour le café, qui ne poussait à l'origine qu'en Arabie et quelques pays d'Afrique, et encore plus le girofle, dont la seule source était les Moluques, jusqu'à ce que Pierre Poivre en fasse voler des plants au bénéfice de la France. Mais on voit la faiblesse de cette recette : il suffit qu'un autre pays se procure des graines et des plants pour que lui aussi entre dans la concurrence ; et si ce pays est plus près des marchés, si ses coûts de production sont moins élevés, eh bien le pionnier voit très vite sa première place lui être disputée. C'est ce qui se passe pour le café dès qu'il commence à être produit massivement dans d'autres colonies. C'est ce qui s'est encore passé pour le girofle ou pour la vanille.

Une autre cause se rajoutant à tout cela est la perte de la réputation du café réunionnais. Le commerçant le recevait de l'habitant sans aucune distinction de prix pour les différentes qualités, surtout lorsque, calculant mieux que l'habitant, il le payait en papier qui perdait de la valeur chaque jour. Les maîtres le recevaient sans plus de façon, parce qu'ils gagnaient assez. Le même prix était attribué aux planteurs ayant pris soin à la récolte et au degré de maturité des fèves, assurant ainsi un bon café à la tasse plus tard, et aux planteurs ayant cueillis sans précaution et sans attendre une bonne maturité. Ainsi bonnes et mauvaises récoltes étaient mélangés (30).

À chaque fois c'est le même scénario : La Réunion est en pointe - première colonie productrice de café, premier producteur de girofle hors des Moluques, premier producteur mondial de vanille cultivée - puis, au bout d'un temps variant de 50 à 80 ans, elle se fait voler sa belle première place, parce que d'autres parviennent à produire moins cher. Moins bon peut-être mais tellement moins cher... Donc le café plonge, bien avant les cyclones de 1806.

Or, la perte de Saint-Domingue prive la France de sa plus belle colonie à sucre, en fait la plus grosse productrice de sucre de la planète, qui fournissait deux tiers au mois du sucre mondial ! Une place est libérée et le sera d'autant plus que la France va perdre d'autres colonies dans les guerres napoléoniennes, dont l'île Maurice. Rien d'étonnant donc à ce que les riches colons n'abandonnent aussi vite le café pour la canne. Les cyclones auront simplement accéléré un processus inéluctable. De 1806 à 2000, la culture du café se perd progressivement. Seuls quelques particuliers continuent à planter et à récolter à titre personnel cette denrée, jadis « or noir » de la colonie. Les terres de plantations caféières, quand elles ne sont pas occupées par de la canne, le deviennent par le géranium. Il y a deux consolations à ce triste scénario : d'une part, la canne est merveilleusement adaptée au climat tropical ; elle résiste bien aux cyclones et protège les sols du ravinement, ce que ne faisait pas le café ; d'autre part, la Région s'intéresse de nouveau au café Bourbon pointu, dont il ne reste que quelques plants, pour une nouvelle culture à haute valeur ajoutée dans les zones anciennement occupées par la production d'essence de géranium.

IV Les mutations naturelles de *C. arabica* et en particulier celle de la mutation Laurina

*IV.1 Les principaux mutants naturels de *C. arabica**

Les mutants naturels sont assez fréquents chez les caféiers cultivés et en particulier chez les Arabica. Plusieurs explications peuvent être apportées à ce fait : le mode de reproduction par autogamie préférentielle et une base génétique étroite associée à une mise en culture à partir d'un très faible nombre d'accession. Ces mutants agronomiquement intéressants ou simplement curieux ont été repérés ou sélectionnés sur des arbres (tiges orthotropes ou plagiotropes mutées) ou dans des descendances et ont été maintenus en collection. Des caféiers à feuilles panachées, à feuilles pourpres, bronzées, à feuilles verticillées, à fruits plus gros, avec des orientations anormales de plagiotropes, avec des floraisons décalées (Chevalier, 1947 ; Carvalho *et al.*, 1991) ont ainsi été obtenus. Ces mutants d'Arabica sont souvent bien caractérisés, tant au niveau botanique que génétique (Carvalho *et al.*, 1991 ; Krug et Carvalho, 1951 ; Krug, 1949). Plusieurs catégories de mutations peuvent être définies, suivant qu'elles touchent le niveau de ploïdie, l'ADN cytoplasmique et/ou l'ADN nucléaire et dans ce dernier cas, avec ou sans la présence de réversion.

Trois grands types de mutants présentant des variations de leur niveau de ploïdie ont été recensés (Krug et Carvalho, 1951) (Tableau I.2) :

- Le type diploïde $2n = 2x = 22$ (« monosperma ») qui serait issu du développement parthénogénétique d'un ovule normalement réduit. Ce mutant est caractérisé par des feuilles étroites et minces, facilement distinguables des feuilles d'Arabica Typica ou Bourbon. Ils sont complètement stériles et comparables aux dihaploïdes Arabica artificiels (Dublin et Parvais, 1976). Enfin, des portions d'individus « monosperma » redeviennent parfois spontanément tétraploïdes ;

- Le type hexaploïde $2n = 6x = 66$ (« bullata hexaploïde »). Il serait issu de la fécondation d'un gamète non-réduits par un gamète réduit ;

- Le type octoploïde $2n = 8n = 88$ (« bullata octoploïde »). Deux origines pourraient expliquer l'apparition de ce type : soit une fécondation de deux diplogamètes, soit une duplication chromosomique spontanée au niveau de branches ou de méristèmes apicaux d'un Arabica tétraploïde. Des plants tétraploïdes qui possèdent des branches octoploïdes ont en effet été recensés. Le bullata octoploïde et le bullata hexaploïde diffèrent par leurs caractères foliaires, le premier ayant des feuilles plus petites et plus coriaces. Les deux types bullata ont des feuilles plus épaisses et plus larges que le tétraploïde normal. La méiose étant anormale, seul un faible pourcentage de gamètes est viable et les descendances sont à 44 chromosomes. Parfois il a été constaté une réduction chromatique de l'octoploïde au tétraploïde –« bullata » à « nacional »).

Plusieurs exemples de mutants chloroplastiques sont dus à la présence de chloroplastes déficients en chlorophylle dans une ou plusieurs couches du tissu foliaire. Lorsqu'une seule de ces couches est affectée, des zones de couleur vert clair et vert foncé sont observées. Leur existence dans deux couches ou plus conduisent à des zones jaunes et même blanches sur les feuilles (Krug, 1949 ; Krug et Carvalho, 1951). Ces plants « variegata » sont des chimères péricleines. D'après les résultats de Krug et Carvalho en 1951, l'interprétation actuelle de ces mutants serait la présence d'une mutation à hérédité nucléo-cytoplasmique.

La majorité des mutations est d'origine nucléaire au sens large (génétique et épigénétique). Krug (1949) a établi les niveaux de dominance ou de récessivité pour une vingtaine d'entre elles en les croisant toutes aux groupes Typica ou Bourbon (Tableaux I.3 et I.4). Les caractéristiques principales générales des mutants géniques peuvent être décrites comme suit :

- Cette vingtaine de mutants peut être classée d'après leur niveau de dominance en

Tableau I.2 : Origine possible des différents mutants de *C. arabica* ($2n = 4x = 44$) présentant des variations de niveau de ploïdie

	$2n = 2x = 22$	$2n = 6x = 66$	$2n = 8x = 88$
Développement parthénogénétique	X		
Non réduction gamétique		X	X
Duplication somatique			X

Dénomination	Génotype	Port	Tige	Rameaux	Direction Des rameaux	Feuille			Floraison	Fleurs				Fruits			Graines			Productivité ⁽¹⁾		
						Dimension	Forme	Couleur		Dimension	Couleur pétale	Calice	Organes		Couleur	Organisation	Forme	Couleur	Organisation		Forme	
								Jeune					Agée	Nombre								Forme
Bronze	Br/br							X														
Cêra	Ce/ce														X							
Anômala	An/an	x		x		x	x			x			x	x		x	x			x (-)		
Angustifolia	Ag/Ag	x	x			x	x								x		x	x		x (-)		
Purpurascens	Pr/pr	x				x	x	x	x	x	x		x	x	x		x	x		x (-)		
Semperflorens	Xc/xc	x			x	x	x		X													
Anormalis	Am/am	x		x		x	x			x			x	x						x (-)		
Caturra	Ct/ct	x		x		x	x													x (+) ?		
Fasciado	Fs/fs	x	x	x		x				x			x	x			x	x		x (-)		
Maragogipe	Mg/mg	x		x		x	x			x			x				x			x (-)		
Laurina	Lr/lr	x		x		x	x							x	x		x	x		x (+) ?		
Mokka	Mo/mo	x		x		x	x			x				x	x		x	x		x (-)		
Erecta	Er/er	x			x															x (-)		
Bourbon (NaNa)	Na/na	x		x			x													x (+)		
Murta (Nana)		x				x	x													x (-)		
Crespa (Crcr)	Cr/cr	x		x		x	x			x				x	x	x				x (-)		

Tableau I.3 : Principaux caractères affectés dans quelques mutations de l'espèce *C. arabica* L par rapport au groupe des Typica (Krug, 1949)

(1) Un signal (-) correspond a une diminution de la productivité, (+) une augmentation de la productivité, « ? » demande confirmation.

Dominante	Dominance incomplète	Récessive
Ct – Caturra	Am – Anormalis	ag – Angustifolia
Cr – Crespa	Br – Bronze	an – Anomala
Er – Erecta	Mo – Mokka	lr – Laurina
Mg - Maragogipe	Na – Nana	pr – purpurascens
	Fs - Fasciacao	sf – Semperflorens

Tableau I.4 : Déterminisme génétique de quelques mutations de l'espèce *C. arabica* L par rapport au groupe des Typica (Krug et Carvalho, 1951). Les lettres représentent le symbole des allèles

trois groupes : approximativement un tiers de dominant, un tiers à dominance incomplète, et un troisième tiers de type récessif par rapport aux Typica. Cette proportion plutôt forte de mutants à dominance complète ou incomplète tend à différencier le caféier de la plupart des autres plantes dont les variants génétiques ont été étudiées (Krug, 1949).

- Plusieurs des mutants récessifs sont très vigoureux et quelques-uns ont une importance économique exceptionnelle. Le groupe Bourbon dérive probablement du groupe Typica à travers la mutation de l'allèle T en t. Les mutants *laurina*, *semperflorens* et *maragogipe* ayant des caractéristiques économiques importantes, sont aussi issus d'une seule mutation récessive.

- Parmi la vingtaine de mutations étudiées en tout, 14 ont un effet pléiotropique, affectant de nombreux caractères de la plante. Citons les mutations *anomala*, *anormalis*, *arespa*, et *laurina*. En revanche, quelques gènes ont un effet très spécifique, comme les gènes *erecta*, *cera* et *bronze*.

- La présence de révertants, chez les mutants *laurina*, *murta* ou *nana* par exemple, caractérisant l'origine épigénétique de la mutation a été observée. Par exemple, la grande instabilité de l'allèle [na] sous certaines circonstances peut produire plusieurs types de chimères. Les plants de phénotype [nana] (génotype na/na) ont eu des branches de phénotype [murta] (forme hétérozygote Na/na) mais qui, suivis d'autofécondation, ont donné des descendance avec une majorité de [nana] (Krug et Carvalho, 1951).

Quatre mutations récessives conduisant au nanisme nous intéressent particulièrement. A l'état homozygote, les allèles récessifs induisent des entre-nœuds courts chez les mutants issus de la variété Bourbon (Krug et Carvalho, 1951; Krug *et al*, 1954). Ces gènes sont : 1) *caturra* Ct ; 2) *mokka* Mo ; 3) *nana* Na ; et 4) *laurina* Lr avec des allèles récessifs respectifs ct, mo, na et lr. Par exemple, la variété Caturra a pour génotype : t Ct Lr Mo Na / t Ct Lr Mo Na, tandis que le nana est : t ct Lr mo Na / t ct Lr mo Na.

IV.2 La mutation Laurina

IV.2.1 Mise en évidence de la variété Bourbon pointu²

IV.2.1.1 Diversité des caféiers arabica existant à l'île de la Réunion

D'autres introductions de caféier ont eu lieu après 1715. Billiard en 1819 écrivait (31) « Je suis fondé à croire qu'il vint encore d'autres plants de caféiers d'Arabie (que ceux en 1715) ». De nombreux auteurs parlent de plusieurs variétés à la Réunion dès le XIX^{ème} siècle. Antoine Roussin parle de café Moka (*Coffea arabica* L.), du café indigène (*Coffea Mauritiana* Lam) mais aussi du café du Bengale (*Bengalensis*, Roxb), le café Le Roy ou Le Roi (Laurina D.C) le café d'Eden, le café Myrte et celui des Comores.

La variété « Bourbon rond » ou *Coffea arabica* var. Bourbon qui s'est démarquée des pieds mères amenés de Moka, et qui étaient la forme la plus couramment cultivée.

Le café connu sous le nom d'Eden est dit venir d'Arabie. « Pendant longtemps, il n'a été cultivé qu'à la Ravine à Marquet et à la Montagne Saint Denis. On en trouve au Champs borne. Si la culture de ce café ne s'est pas répandue, c'est que ses produits sont beaucoup moins abondants que ceux des autres variétés. L'arbre est moins élevé ; il est plus délicat, ses feuilles d'un vert moins foncé sont, comme celles du giroflier, rougeâtre vers leur extrémité : les deux fèves du fruit, au lieu d'être oblongues, sont hémisphériques, de la force d'une grosse lentille » (32). Cette description est supportée par les écrits d'Hubert : « Il a été introduit une espèce de café, que je ne crois pas venir de Moka. On l'a appelé café d'Eden. L'arbre est plus petit, les fèves beaucoup plus petits aussi. (...) Eden n'est pas autre chose qu'Aden, prononcé comme le font les anglais (...) » (33). Le Café d'Eden, café d'Aden, d'Oudein, petit Bourbon rond seraient de la même variété (Chevalier, 1947) : *C. arabica* var. mokka et elle aurait été introduite en 1823 à la Réunion.

Le café de Myrte, ainsi nommé, à cause de la forme de sa feuille, a été considéré pendant longtemps comme une espèce particulière : mais le modeste et savant M. Richard, directeur du jardin botanique de l'île Bourbon, a reconnu que ce n'est qu'une variété du Moka. Par les semis le caféier myrte retourne à son type primitif.

² Par souci de clarté, la bibliographie de cette partie provenant d'archives, les sources documentaires seront ici indiquées chronologiquement par un numéro et seront répertoriées avec le reste de la bibliographie à la fin du manuscrit.

Quant au café du Bengale et celui des Comores, ce ne sont que des plantes de collections. Il s'agit peut-être respectivement de « *Coffea bengalensis* Heyne ex Roem. et Schult » (paracoffea) et de *Coffea humblotiana* Baillon.

Enfin on trouve sur l'île le *Coffea arabica* var. *Laurina*, ou café Leroy, Le roi, *Laurina* ou Bourbon pointu (Figure I.5) Krug et Carvalho (1939) citent de nombreux autres noms au Bourbon pointu et précise qu'ils décrivent bien tous la même variété : *Coffea arabica* L. var. *laurina* (Smeathman) D.C, *Coffea laurina* Smeathman, *Coffea laurina* Hort avec les autres noms communs non cités de café Murta ou café de Smyrna. Chevalier (1947), fait la différence entre *Coffea arabica* var. *Laurina* Hort. Ex. Cramer et *Coffea arabica* var. *Laurina* J.L de Lanessan, mais ces deux variétés semblent être les mêmes. Toutes deux sont d'ailleurs décrites comme des mutations issues de la Réunion. De même, Costes (1954) la décrit sous le nom de *C. arabica* L. var *laurina* J-L de Lanessan : « Petit arbuste considéré comme une mutation, né à la Réunion, de *C. arabica* var. *bourbon*. Connu souvent sous la dénomination de « Bourbon Pointu », il fructifie peu, mais est réputé pour la qualité de sa production ». Billiard (1817-1820) décrit le Bourbon pointu comme ayant « le port d'un arbre d'ornement ; il s'élève en pyramide ; ses branches se détachent toutes d'une tige commune ; leurs nœuds sont beaucoup plus rapprochés que dans le caféier d'Arabie, ce qui le en rend le produit beaucoup plus abondant ; il se plaît dans les régions élevées et même un peu froides. Le grain est plus allongé que celui de l'autre caféier, il est également riche en parfum et en extrait. De tous les quartiers de la colonie, Saint Leu est celui qui produit le plus de café, et peut-être le meilleur café » (34).

IV.2.1.2 L'origine du café Leroy ou [Bourbon] pointu

L'origine du Bourbon pointu a été pendant très longtemps controversée.

Pour certains auteurs, le Bourbon pointu est bien apparu à la Réunion. D'après Raoul (1894) (35) : « [II] *Descend d'un plan trouvé au commencement du siècle à la Ravine-aux-chèvres (Bourbon) qui faisait partie des terres de M. Auguste Pajot. Ce dernier lui donna le nom de son gérant, un ancien matelot nommé Roy ou Le Roy qui l'avait découvert* ». « *Autrefois, le grain provenant de caféier Leroy était très allongé ; par la culture il a perdu de sa forme typique, mais néanmoins il est resté encore assez aigu à une de ses extrémités pour justifier le nom de Bourbon pointu. Il a été adopté par les planteurs vers 1810, à cause*

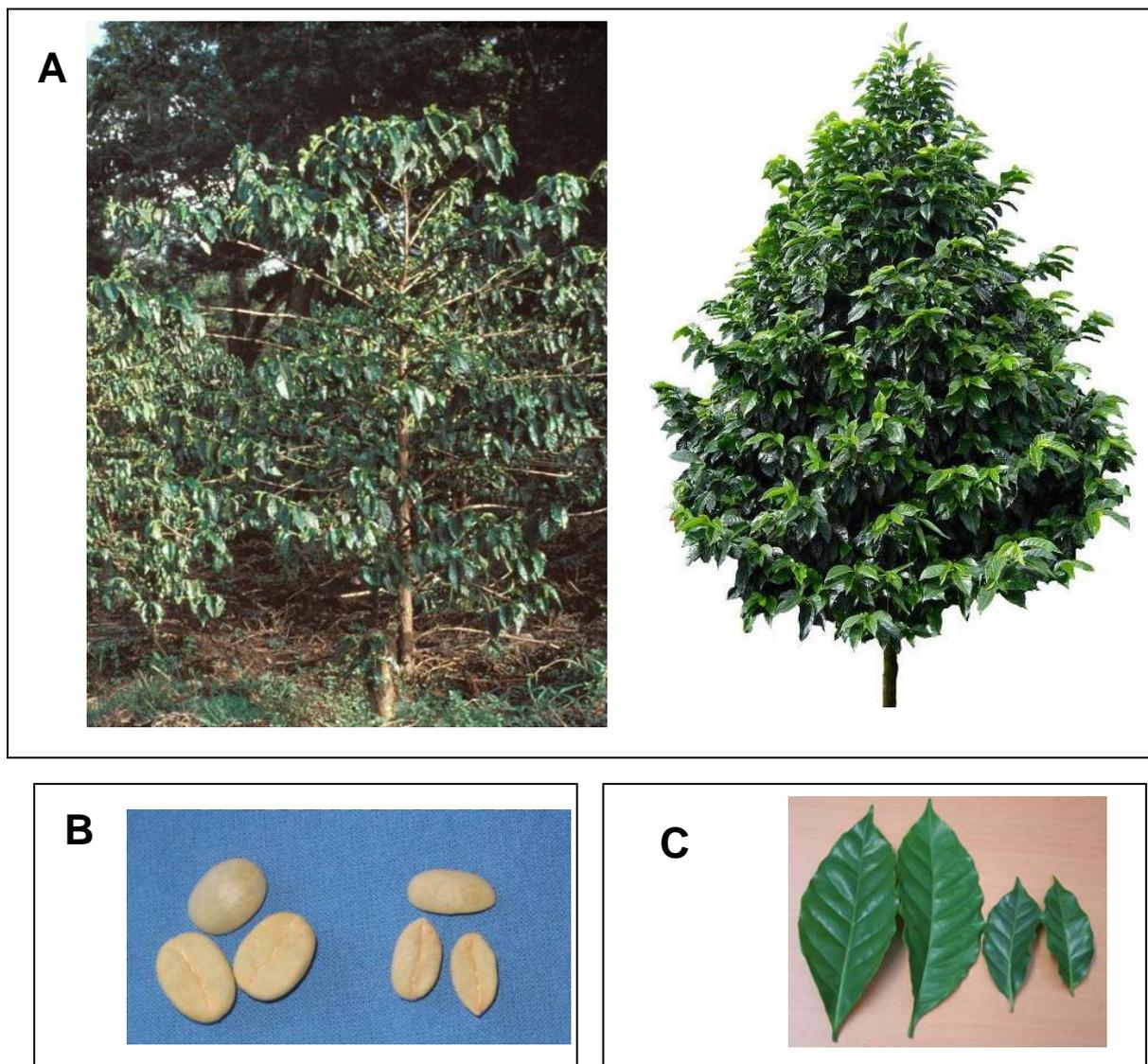


Figure I.5 : Caractéristiques morphologiques du Bourbon (à gauche sur les figures) et du Bourbon pointu (à droite sur les figures). A) Port général des arbres – l’arbre du Bourbon y mesure 2m20, celui du Bourbon pointu 1m75- B) Graines -hauteur de la photo : 3,3 cm- C) Feuilles –hauteur de la photo : 10, 2cm-

de sa résistance à la sécheresse, à une époque où le Moka³ commençait déjà à ne plus venir aussi bien que dans les premiers temps de sa culture » (35).

En revanche, pour un certain nombre d'autres auteurs par contre, le café Leroy serait d'origine Africaine. Les écrits de ces auteurs sont souvent des récits de voyage, des histoires racontées ou des recueils quant à l'histoire de l'île Bourbon. Auguste Billiard (36) écrit ceci : « Une nouvelle variété de caféier, connue dans la colonie, sous le nom de café Le Roi, c'est je crois, la même que celle connue aux Antilles sous le nom de café d'Ethiopie ; elles sont l'une et l'autre originaire de la cote orientale d'Afrique ; il y a vingt quatre ans environ que les graines de cette variété cultivée à Bourbon furent apportées par un capitaine qui en fit un semis et distribua les jeunes plants à quelques cultivateurs de la partie du vent. Monsieur Le Roy, ayant acheté dans le quartier de Sainte Marie, une habitation où la mortalité avait détruit une partie des caféiers, reconnut qu'elle avait épargné un carré d'une espèce particulière qui n'était autre chose que le caféier d'Afrique. ». Antoine Roussin lors de son voyage à la Réunion aux alentours de 1880 rejoint ce récit en donnant d'autant plus de détails sur cette hypothétique introduction du Bourbon pointu (37). Emile Trouette qui a publié en 1898 une brochure fort intéressante qui a pour titre *Introduction des végétaux à la Réunion. Notes historiques* dit ceci à l'article caféier : « Caféier le Roy (*Coffea laurina*) Origine incertaine d'après Joseph Hubert (38), suivant d'autres introduit de la côte d'Afrique en 1771 par Wolf, voyageur allemand [qui en donna à Monsieur Bourdier, ingénieur à Bourbon]. S'est appelé le Roy dans ce siècle du nom d'un propriétaire ou plutôt d'un régisseur de Sainte Marie qui le premier, en a fait remarquer la bonne tenue et en a distribué des semences et des plants »

Comme le dit à juste titre DeVillèle en 1920 (39), l'allemand peut avoir porté à l'île Bourbon de la semence d'un caféier nouveau découvert par lui en Afrique en 1770, Monsieur Bourdier peut avoir fait un semis de ces graines à Saint Denis et distribué des plants à divers planteurs, cela ne veut pas dire que le caféier Le Roy vienne de cette introduction. Les semences sont rarement suivies, mis en culture puis perdues de vue ou détruites. Sans soins, ces plantes meurent et il n'en est plus question. Il peut en être ainsi des plants distribués par Monsieur Bourdier.

Les voyageurs de XIXe et XXe siècle n'ont pourtant encore jamais trouvé sur la côte Orientale d'Afrique le caféier à graines longues et pointues que nous nommons ici caféier le

³ Le Moka dont il parle ne se rattache au *Coffea arabica* var. *moka* (Hort. Ex Heynth) Cramer mais au café introduit de Mocha au XVIIIeme siècle autrefois la forme couramment cultivée à la Réunion.

Roy. Dès 1920, Auguste De Villèle (40) remet en cause l'introduction du Bourbon pointu d'Afrique et dit « *Si les générations spontanées ne peuvent exister, dans la nature, il peut s'y produire cependant des variations dans le règne végétal par le fait du climat, de l'habitat et des types nouveaux peuvent apparaître grâce à l'intervention fortuite d'insectes, ou à la volonté de l'homme dirigeant la fécondation des fleurs dans un sens déterminé* ». Il recherche alors une explication possible de l'apparition de cette variété, la notion de mutation n'étant pas encore connue à l'époque. Il retrace en revanche, selon des traditions de famille « *inspirant la plus grande confiance* », l'histoire de l'identification du Bourbon pointu. « *Nous savons depuis fort longtemps que sur la propriété de la Ravine au Chèvres, appartenant autrefois à M. Auguste Pajot et aujourd'hui au Crédit Foncier Colonial sous le nom de la Ressource en témoignage de sa bonté qu'on a découvert le caféier dont nous nous occupons. Monsieur le Roy, ancien soldat resté dans la colonie, après son service, s'était employé à Sainte Marie, chez monsieur Pajot. Il s'y occupait de la culture. Ayant remarqué que dans les plates bandes de semis de caféiers faits avec des semences récoltées sur place quelques plants présentaient des feuilles d'un port différent du caféier d'Arabie communément nommé café du pays, il fit part de son observation à Monsieur Pajot qui lui dit qu'on suivrait particulièrement la venue de ces plants et que s'ils étaient reconnus supérieurs aux autres, on leur donnerait son nom. C'est ce qui eut lieu* ». Il recherche alors une explication dans l'hybridation et les principes de croisement connus à l'époque. « *Nous étions persuadés par le raisonnement que si sur une propriété où on n'avait fait aucune introduction de caféiers étrangers, apparaissaient une variété nouvelle, il y avait dû y avoir une modification dans la fécondation de quelques fleurs par un agent étranger à la culture. Si le caféier marron découvert à l'île Bourbon au moment même où les premiers plants de caféier de Moka y avaient été introduits se trouvait dans le voisinage d'une caféière, il est tout naturel qu'une abeille qui après y avoir butiné aurait continué sa récolte de pollen sur un caféier arabica en aurait fécondé les pistils avec la semence du caféier marron. Quand la maturité des cerises eut lieu sur cet arbuste ou s'était opéré la fécondation croisée, on du récolter celles en provenant sans remarquer qu'une différence existait entre leurs formes et celles des caféiers communs. Quelques graines ont suffi pour créer la variété du caféier Leroy grâce à un coup d'œil d'un employé ayant su observer et à un propriétaire qui a eu la volonté de suivre le développement des plants obtenus et d'en comparer la venue et la production avec celles des autres caféiers.* » Il trouva même une preuve scientifique à son opinion par l'analyse chimique des grains et du taux de caféine. Le travail fut entrepris au commencement de l'année 1907. Le café Leroy « hybride » avait un dosage de caféine de 0,440, le café

marron de 0 et le café arabica 0,820. Pour De Villèle, et les nombreux auteurs qui le reprennent, le fait que le café Leroy tiennent le milieu entre le café marron (*Coffea mauritiana*) et le café Arabica montre qu'il est hybride entre ces deux variétés, et qu'il ne provient pas d'autre pays que de la colonie.

A l'époque, voir à travers une plantation homogène, l'apparition d'un plant « aberrant » ne pouvait être expliquée que par une introduction ou une fécondation croisée. Pourtant l'origine du Bourbon pointu a trouvé explication bien plus tard.

IV.2.2 Analyses génétiques et biochimiques de la mutation

Aujourd'hui, les différentes analyses biochimiques et génétiques menées sur la variété Bourbon pointu montrent qu'elle découle en fait d'une mutation récessive de la variété Bourbon (Krug, 1949 ; Krug et Carvalho, 1951 ; Krug *et al.*, 1954). Les hybrides F1 entre Bourbon et Bourbon pointu sont du type *Lrlr* et montrent un phénotype Bourbon, avec dominance de l'allèle *Lr*. Dans la génération F2, la ségrégation a été de 75 % de Bourbon contre 25% de Bourbon pointu, correspondant bien aux règles de descendance de Mendel. Ceci a été confirmé par des *back-cross* sur des Bourbon (100% de phénotypes Bourbon dans la descendance) ou sur des Bourbon pointu (50% de Bourbon et 50% de Bourbon pointu). Ainsi, les génotypes Bourbon et Bourbon pointu sont respectivement *LrLr* et *lrlr*. La mutation Laurina est donc monogénique et récessive. Elle a créé une variété nouvelle, stable même si elle est aussi connue pour montrer un taux de réversion important (Figure I.6). Son effet est pléiotropique et affecte aussi bien le port de l'arbre que les caractéristiques biochimiques du grain. Peu de dosages sont publiés à l'heure actuelle, mise à part cette concernant la teneur en caféine. Cette dernière dans les grains de Bourbon pointu est comparable à celle observée chez *C. eugenoides* (Charrier et Berthaud, 1975 ; Anthony *et al.*, 1993, Mazzafera *et al.*, 1997 ; Ky *et al.*, 2001) et deux fois moindre que chez le Bourbon (De Villèle, (40)). De même, le port pyramidal de l'arbre rappelle aussi l'espèce *C. eugenoides* (com. personnelle Noirot M.).

Même si l'histoire apporte des renseignements importants et représentent des ressources inestimables qui permettent d'orienter les recherches scientifiques, il est clair que ces mêmes recherches permettent à leur tour de faire la part dans la compréhension et à l'interprétation des récits historiques. Nous verrons dans la suite du document comment des preuves scientifiques appuient la première hypothèse historique, celle de la mutation apparue à la Réunion, par rapport aux deux autres hypothèses (introduction de la côte africaine ou hybridation entre *C. mauritiana* et *C. arabica*).



Figure I.6 : Bourbon pointu présentant des réversions somatiques au niveau de certaines branches. Arbres présents sur des plantations de Nouvelle Calédonie. (Photos Serge Hamon, IRD Montpellier).

V Caractérisation des mutants naturels

Au XIXème siècle, Waagen avait appliqué le terme « mutation » aux changements brusques survenus dans des séries temporelles d'Ammonites. De Vries en 1901 l'a utilisé pour la première fois en Génétique pour décrire l'apparition spontanée de variations phénotypiques transmissibles au sein de priméroses ou d'autres espèces végétales (De Vries, 1901). La mutation sera définie ici comme un changement du matériel héréditaire qui n'est pas dû à la ségrégation (séparation des chromosomes homologues durant la méiose) ou à la recombinaison par *crossing over*. Cette dernière est prise ici dans le sens de la recombinaison "normale" et inclut la recombinaison intragénique entre allèles différents. Cette altération du matériel héréditaire n'est donc pas présente chez les parents ni en l'état, ni en puissance par réassortiment. Il est d'usage de considérer un *crossing over* inégal comme une mutation, bien qu'entrant dans le cadre d'une recombinaison. Il est le plus souvent bien difficile d'affirmer qu'un nouvel allèle n'est pas apparu par recombinaison intragénique entre deux allèles déjà existants. Il en va de même pour la variation génétique imputable à l'insertion de séquences mobiles d'ADN.

Toute la diversité du monde vivant est issue de mutations accumulées au cours du temps. Néanmoins, nous restreindrons le terme de « mutants naturels » aux individus issus de mutations apparues spontanément au cours du temps et dans cette étude aux mutations identifiées à partir de formes sauvages cultivées et domestiquées par l'Homme. Ces mutants n'ont pas été générés par des biotechnologies, ce qui les différencie des mutants artificiels.

La variation naturelle possède certains avantages par rapport aux mutations artificielles, et cela malgré par exemple les succès des mutants d'insertion par T-DNA d'*Arabidopsis thaliana* (Azpiroz-Leehan et Feldmann, 1997), par des approches utilisant des transposons chez le maïs, chez *Arabidopsis* (Martienssen, 1998) et chez la tomate (Bishop *et al.*, 1996) ou encore par les anciennes techniques de mutagenèse par des agents ionisants ou chimiques. L'un des avantages principaux est que ces mutations existent dans toutes les espèces et qu'elles sont disponibles. La probabilité d'obtenir par biotechnologie la même mutation reste infime. La longueur du cycle de vie de certaines espèces, comme les plantes pérennes, limite considérablement la possibilité de mutagenèse artificielle. Même dans l'espèce *Arabidopsis thaliana*, la variation naturelle est considérée comme sous-utilisée et une réflexion s'est engagée pour prendre en compte son intérêt complémentaire vis-à-vis des banques de mutants (Alonso-Blanco et Koornneef, 2000). Nous ne ferons pas ici de

distinctions entre les mutations ou épimutations nucléaires et celles qui sont cytoplasmiques, conférées par l'ADN des mitochondries et des chloroplastes.

Ce document cherche à décrire comment, historiquement et de nos jours, les mutations naturelles sont caractérisées. Après avoir présenté plus en détail les mutations naturelles au sens large (comprenant les mutations au sens strict et les épimutations naturelles), leurs différences et leurs similitudes, nous aborderons les moyens de les identifier et de les cloner. Enfin, nous présenterons les moyens disponibles afin de caractériser, non la mutation elle-même, mais les effets de la mutation.

V.1 Mutations et épimutations naturelles

Les changements de séquences de l'ADN sont longtemps apparus avec la ségrégation et la recombinaison génétique comme l'unique source de diversité dans les populations. Cependant, une variabilité peut apparaître dans une population sans changement de la séquence ADN, comme par exemple à la suite d'une modification post-traductionnelle des histones. Ces changements, qualifiés d'épigénétiques peuvent contrôler l'expression des gènes et sont transmissibles en mitose, voire en méiose (Kakutani *et al.*, 1999 ; Kakutani, 2002). L'altération des marques épigénétiques peut modifier l'état d'activité normale d'un gène et contribuer à d'importantes variations phénotypiques. Ce sont les épimutations caractérisées par une séquence nucléotidique de l'ADN non modifiée.

Si la mutation ou l'épimutation peuvent donner le même phénotype, elles diffèrent par bien des aspects que les paragraphes suivants vont présenter.

V.1.1 Caractéristiques des mutations génétiques

V.1.1.1 Définition

La génétique est l'étude de la transmission des caractères héréditaires afin de déterminer le génotype à partir du phénotype. Elle repose par définition sur la possibilité d'observer des variations transmissibles de ces caractères. Ces changements peuvent être engendrés par les modifications de la séquence des nucléotides. Les premières caractérisations extensives de mutations proviennent de la drosophile et remontent au début du XX^{ème} siècle grâce aux travaux du généticien Thomas Hunt Morgan (Morgan *et al.*, 1925).

Lors d'une mutation, l'altération de la séquence des nucléotides engendre une modification de génotype, se traduisant ou non par un changement de phénotype observable. Ce changement permet de repérer la mutation, en la rendant perceptible au niveau de

l'organisme. Classiquement, les mutations peuvent se produire à trois niveaux différents (Tableau I.5) (article de synthèse Alberts *et al.*, 2002) :

- les mutations géniques « ponctuelles » impliquent des erreurs de petite taille dues au changement d'une base par une autre, à l'addition ou à la délétion de quelques nucléotides dans une séquence d'ADN ;
- les altérations chromosomiques entraînent des modifications importantes de la structure des chromosomes (telles que des translocations, délétions, inversions) par gain, perte ou ré-arrangement de segments chromosomiques ;
- les mutations génomiques concernent le avec changement du nombre de chromosomes sans changement de structure de ces derniers (aneuploïdie et polyplœdie).

V.1.1.2 Modalités d'apparition et fréquence des mutations

Des erreurs dans la réplication ou la réparation de l'ADN sont à l'origine de la plupart des mutations spontanément apparues dans les cellules. La réplication de l'ADN, mécanisme pourtant extrêmement fidèle, n'est pas fiable à 100%. Le faible taux d'erreur induite de la synthèse de l'ADN a été estimé à un nucléotide sur un milliard (10^{-9}). Il est néanmoins variable en fonction des locus considérés et de l'organisme. Le nombre d'erreurs est en fait plus élevé, mais il est considérablement réduit par l'activité correctrice («proofreading») des polymérases d'une part, et par le processus de réparation post-répliatif de l'ADN d'autre part. Les erreurs de réplication ou de réparation provoquent en grande majorité des substitutions de base, des petites délétions ou insertions de nucléotides entraînant parfois des décalages de phase de lecture. Au sein de la cellule, l'ADN est également la cible de variations spontanées, comme avec la dépurination ou la désamination. Les lésions de l'ADN peuvent aussi résulter d'agressions chimiques endogènes, comme les radicaux libres, ou par des facteurs exogènes, comme certains rayons atmosphériques. Enfin, les éléments mobiles ou transposons (ETs) se déplacent spontanément d'une position à l'autre dans un génome ; ils sont à l'origine de mutations très diverses, créées par insertion *de novo* ou par excision imparfaite. La très grande majorité de ces erreurs étant éliminée avec une efficacité remarquable par le processus de réparation de l'ADN, le taux de ces mutations spontanées est faible : moins d'une modification accidentelle de base sur un millier dans l'ADN n'est pas réparée (Kornberg et Baker, 1992).

Le taux de mutation est la probabilité d'apparition d'un type donné de mutation par unité de temps. L'unité de temps peut être définie en génération de cellules, de division cellulaire (cycle de réplication), ou d'organisme. Dans la pratique, ce paramètre est difficile à

Tableau I.5 : Classification et caractéristiques générales des mutations (Alberts *et al.*, 2002)

<p>I. MUTATIONS GENIQUES</p> <p>Changement héréditaire survenant dans un seul gène soit par changement de base, soit par insertion ou excision d'une séquence d'ADN mobilisée. Il en résulte un nouvel état allélique.</p>
<p>II. MUTATIONS CHROMOSOMIQUES</p> <p>Changements de structure des chromosomes par gain, perte ou réarrangement de segments chromosomiques :</p> <ul style="list-style-type: none"> - intrachromosomiques (homosomiques), sur un seul bras (paracentrique ou homobrachial) ou sur les deux bras (péricentrique ou hétérobrachial) - interchromosomiques (interchanges) entre homologues (allosomiques) ou hétérologues (hétérosomiques). <p>A. Délétion : perte d'un segment intercalaire. La déficience est la perte d'un segment terminal.</p> <p>B. Duplication : répétition d'un fragment de chromosome : interchromosomique : le segment dupliqué est répété sur un non homologue ; intrachromosomique : répétition sur un même chromosome. Un bras entier est dupliqué, reconduit à un isochromosome (pour les chromosomes telocentriques).</p> <p>C. Inversion : retournement de 180° d'une portion de chromosome. Inversions simples: paracentriques (un bras) ou péricentriques (deux bras) ou complexes : indépendantes, en tandem (contiguës), incluses ou chevauchantes.</p> <p>D. Translocation : déplacement de segments chromosomiques, intrachromosomiques ou interchromosomiques. Les translocations mutuelles ou réciproques sont des interchanges. Elles peuvent porter sur des bras entiers.</p> <p>E. Fusion centrique/dissociation : formation d'un métacentrique à partir de deux acrocentriques non homologues (fusion) ou inversement (dissociation). Fusion en tandem: formation d'un acrocentrique long à partir de deux acrocentriques non homologues.</p>
<p>III. MUTATIONS GENOMIQUES</p> <p>Changement du nombre de chromosomes sans changement de structure : hétéroplöidie recouvrant aneuploïdie et polyplöidie.</p> <p>A. Aneuploïdie : changement du nombre de base de chromosomes, portant sur un ou quelques chromosomes entiers, mais non sur l'ensemble du lot haploïde (n). Les aneuploïdies peuvent être doubles ou multiples (pseudoaneuploïdies) : double trisomie ($2n+1+1$).</p> <p>B. Euploïdie : Présence du lot haploïde complet à un ou plusieurs exemplaires. Le lot haploïde est appelé le nombre de base (x).</p> <ul style="list-style-type: none"> - monoploïdie : un seul lot haploïde (remplace ce terme lorsque cette garniture caractérise une phase cycle biologique qui n'est pas normalement haploïde). - diploïdie : deux lots haploïdes - tri-, tétra-, penta-, hexaploïdie : présence de 3, 4, 5 ou 6 lots haploïdes. Les périssoploïdes sont de rang impair, les artioploïdes de rang pair. - autopolyploïdes : répétition du même lot haploïde - allopolyploïdes : présence pour un degré de plöidie supérieur à 2, de lots haploïdes d'origines différentes. Un amphidiploïde est un allotétraploïde. - allopolyploïdes segmentaires : allopolyploïdes pour lesquels existe une homologie partielle des lots haploïdes - autoallopolyploïdie : combinaison de l'auto- et de l'allopolyploïdie

estimer. Les mesures du taux de mutation reposent sur des estimations, essentiellement basées sur des études phénotypiques de descendance issue de sexualité ou non en laboratoire. D'après certaines observations, ce taux de mutation est sous-estimé, ne prenant pas en compte ni les mutations létales, ni les mutations neutres ou silencieuses (Denver *et al.*, 2004; Rosenberg et Hastings, 2004). D'après la théorie de Kimura, 99% des changements nucléotidiques seraient neutres ou légèrement délétères, ne conférant à l'espèce ni avantages, ni désavantages et ne pouvant être fixés par dérive génétique (Kimura, 1968; Kimura, 1983). Enfin, un certain nombre de mutations semblent être « masquées » par l'intervention des protéines chaperonnes, notamment la Hsp90. Celle-ci aide en effet à la stabilisation de protéines régulatrices nouvellement traduites et est par ailleurs induite en cas de stress. La perte de la chaperonne Hsp90 chez *Drosophila melanogaster*, comme chez *Arabidopsis thaliana*, révèle un ensemble d'anomalies morphologiques. Celles-ci seraient causées par de multiples mutations cryptiques (Queitsch *et al.* 2002; Rutherford et Lindquist, 1998).

Une autre méthode indirecte permet d'estimer les taux de mutation en l'assimilant aux taux de substitution non entravé par la sélection, calculé pour les sites "neutres". Pour les pseudogènes de Mammifères, ce taux s'élève à $4,5 \times 10^{-9}$ /site nucléotidique/an (Li *et al.*, 1981), et à $1,5 \times 10^{-8}$ pour la troisième base des codons chez la Drosophile (Sharp et Li, 1989). Des travaux de recherche sur le blé dur (*Triticum durum*) basée sur des microsatellites amène à un taux de l'ordre de $2,4 \times 10^{-4}$ par allèle et par génération (Thuillet *et al.*, 2002). Le taux de mutation pour les microsatellites chez les plantes est plus élevé que chez les animaux (Thuillet *et al.*, 2002 ; Bataillon, 2000).

V.1.1.3 Propriétés des mutations

Si elle n'est pas corrigée par la machinerie de réparation de l'ADN et si elle est viable, une mutation est transmissible de manière stable, au travers des divisions cellulaires, même en l'absence de l'agent inducteur ou de l'agent permettant de la sélectionner. Dans un organisme pluricellulaire à reproduction sexuée, si la mutation a touché la lignée germinale ou un tissu à l'origine de cellules reproductrices, elle peut alors être transmise à la descendance et devient héréditaire. En revanche, une mutation apparaissant dans un autre tissu somatique en développement n'est pas transmissible en méiose, mais provoquera le maintien de l'altération dans la descendance de la cellule mutée initialement.

Les mutations apparaissent toujours de manière aléatoire. Des séquences fortement mutagènes existent pourtant dans les génomes et correspondent à des sites mutant à une

fréquence plus élevée que la moyenne. Ce sont les points chauds de mutation. Ils coïncident le plus souvent à des micro- ou minisatellites, courts motifs de deux à quelques dizaines de nucléotides, répétés de nombreuses fois en tandem dans les génomes. Ils mutent principalement par la perte ou le gain d'une ou plusieurs de ces répétitions, en raison du phénomène de glissement de la polymérase lors de la réplication pour les microsatellites (Freimer et Slatkin, 1996) ou par *crossing-over* inégal dans le cas des minisatellites (Jeffreys *et al.*, 1985). D'après une étude récente, les microsatellites pourraient altérer le taux et la distribution des mutations à leur proximité immédiate (Vowles et Amos, 2004). Les mécanismes conduisant à ce système d'évolution convergente sont peu clairs, mais semblent séquence-dépendants.

Par ailleurs, dans les génomes eucaryotes présentant une méthylation de l'ADN, une forte fréquence de transitions de C vers T est observée (Shen *et al.*, 1994). Cette augmentation résulte de deux phénomènes : 1) l'instabilité (par désamination spontanée) deux fois plus élevée des résidus cytosines méthylées, comparée à celle des cytosines non méthylées ; 2) la machinerie de réparation pour les mésappariements U:G, moins efficace pour les paires T:G. En effet, la désamination d'une cytosine non méthylée donne un uracile alors que celle d'une cytosine méthylée donne une thymidine. (Schmutte *et al.*, 1995). Le dinucléotide CG, très souvent méthylé chez les mammifères, est ainsi un point chaud de mutation avec un taux de mutation environ 8,5 fois plus élevé que pour la moyenne des autres dinucléotides (Cooper *et al.*, 1995).

Enfin, à la fois chez les bactéries et chez de nombreux eucaryotes (levure, plantes, mammifères), des points chauds d'insertion d'éléments transposables existent, constituant donc des sites préférentiels de mutation (Craig, 1997 ; Kazazian, 2004).

Les mutations apparaissent indépendamment les unes des autres : si deux mutations se produisent dans une même cellule, l'apparition de la première n'aura en général aucune influence sur le type, la fréquence ou le site d'apparition de la seconde. Le séquençage des génomes a montré la duplication d'une mutation, comme les copies identiques de gènes ARNr chez l'espèce *Xenopus laevis* (Elder et Turner, 1995). Elle se produirait par des processus de conversion génique ou analogue (Liao, 1999). C'est ce qu'on appelle l'évolution concertée.

Les mutations sont très rarement réversibles : si la fréquence d'apparition d'une mutation est très faible, la fréquence de réversion de la mutation nucléotidique vers la structure initiale sauvage du gène l'est encore moins (puisque la mutation a un tiers de chance de revenir sur le bon nucléotide). Elle est quasi-nulle dans le cas de délétion ou d'insertion

nucléotidiques sauf processus de conversion génique chez les hétérozygotes. Mis à part ces types de réversion « vraie », les mutations « supprimeur » peuvent tout de même apparaître comme un mécanisme de réversion : une seconde mutation restaure alors une fonction annulée par une première mutation, mais sans forcément toucher le même locus. Certaines, dites « instables », montrent des taux de réversion plus élevés que la moyenne. C'est le cas des mutations causées par l'insertion d'éléments transposables. La première observation de ce type d'événements de réversion remonte aux années 30 avec les travaux de Marcus Rhoades (Rhoades, 1938). Les transposons à ADN peuvent s'exciser de cette même séquence avec une fréquence parfois élevée en laissant peu ou pas de traces au site d'excision. La structure sauvage initiale est restaurée et le gène est de nouveau fonctionnel. Les mutations causées par un glissement de l'ADN polymérase au niveau des séquences microsatellites sont également instables. Elles peuvent en effet varier d'un état à un autre par ajout puis délétion de répétitions pendant des réplifications successives, rendant possible un retour à la séquence initiale.

V.1.2 Caractéristiques des épimutations

V.1.2.1 Définition des épimutations

Le terme « épigénétique » provient de « épigénèse » (en grec "epi" signifie "sur") et de « génétique ». Le terme décrit l'ensemble des interactions existant entre gènes/environnement et conduisant à l'expression phénotypique de ces gènes au cours du développement (Waddington, 1942). Aujourd'hui, ce terme désigne le plus souvent des modifications héréditaires de la chromatine sans changement de la séquence nucléotidique (Wu et Morris, 2001), comme la méthylation de l'ADN ou les modifications post-traductionnelles des histones. Les épimutations affectent l'expression des gènes, mais aussi la réplication ou la recombinaison. Dans les génomes eucaryotes, les contrôles épigénétiques s'exercent principalement sur les éléments transposables (transposons à ADN et rétrotransposons) et leurs reliques, constituants majeurs de nombreux génomes animaux ou végétaux (Martienssen et Colot, 2001). Des gènes essentiels sont sujets à des contrôles épigénétiques comme le démontrent les épimutants décrits chez *Arabidopsis*. Ce sont par exemple les gènes *FLC* et *FWA*, jouant un rôle dans le temps de floraison et le locus *BAL* intervenant dans la réponse aux pathogènes.

Ces modifications apparaissent et sont maintenues de manière contrôlée dans la cellule. Lorsque l'ADN se réplique, toutes ces empreintes sont en effet reproduites à

l'identique sur le brin néosynthétisé, par divers mécanismes encore mal connus. Tout variant épigénétique est donc transmissible en mitose. Pour l'être à travers les générations, l'épimutation doit résister aux réparations par conversion génique ayant lieu lors de la méiose (Holliday, 1987). L'altération de l'état épigénétique « sauvage » conduit à la génération d'épimutations. Si ce changement touche un gène, son expression peut être affectée et d'importantes conséquences phénotypiques peuvent se produire (Holliday et Pugh, 1975 ; Riggs, 1975). Le terme épimutation est à rapprocher du terme épiallèle signifiant qu'un même gène peut exister sous différents états épigénétiques, engendrant ainsi des variations de phénotype. Les épimutations sont donc des générateurs d'épiallèles d'un même gène.

V.1.2.2 Modalités d'apparition des épimutations

Comme les mutations, les épimutations peuvent apparaître de manière spontanée, ou bien être induites à la suite d'une exposition à des facteurs épimutagènes, environnementaux ou au cours du développement. Des mutations dans des gènes impliqués dans la dynamique chromatinienne peuvent aussi induire des épimutations.

V.1.2.2.1 Apparition spontanée

Toute modification épigénétique est par définition transmissible en mitose, pendant de nombreuses générations. Elle est ainsi répliquée sur le brin néosynthétisé, à chaque division cellulaire. Le système de maintenance de la méthylation des cytosines dans les sites «symétrique» CG de l'ADN est bien connu. Après la réplication, ces motifs de l'ADN sont « hemi-méthylés » et les ADN-méthyltransférases de maintenance les reconnaissent avec une très forte affinité. Ces dernières méthylent alors la cytosine qui ne l'est pas sur le brin complémentaire (Figure I.7). Le système de propagation des modifications post-traductionnelles des histones à travers les divisions cellulaires est encore peu connu. Des protéines non-histones pourraient y jouer un rôle (Henikoff *et al.*, 2004). De plus, la méthylation de l'ADN et certaines méthylation des histones sont interdépendantes l'une de l'autre chez divers organismes, tels que *Arabidopsis*, *Neurospora* (Johnson *et al.*, 2002; Tamaru et Selker, 2001; Tariq *et al.*, 2003) ou les mammifères (Fuks *et al.*, 2003; Lehnertz *et al.*, 2003). Comme la réplication pour les mutations, le système de maintenance de la méthylation et autres modifications n'est sans doute pas fiable à 100%. L'efficacité de reproduction de la méthylation de l'ADN par exemple peut descendre jusqu'à 94 % (Wigler *et*

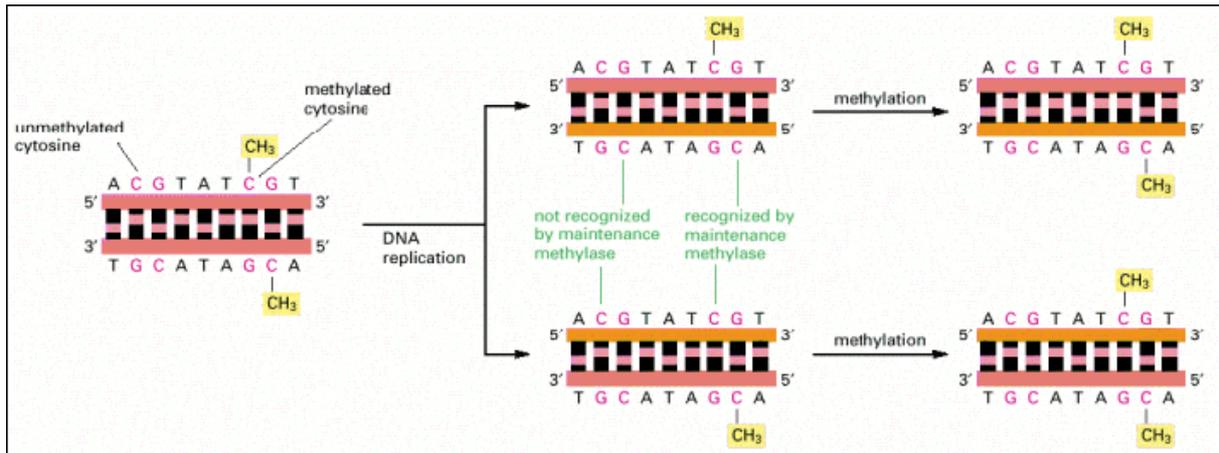


Figure I.7 : Modèle de maintenance des profils de méthylation CpG de l'ADN, au cours de la réplication. Sur la molécule d'ADN parentale, les deux brins sont méthylés (CH₃) sur les cytosines de certains sites CpG. Après la réplication, seul le brin parental de chaque molécule fille est méthylé. Le brin néosynthétisé est alors méthylé par une ADN-méthyltransférase de maintenance, qui reconnaît spécifiquement les cytosines non méthylées en face d'un résidu qui l'est.

Une fois un profil de méthylation établi, chaque site nouvellement méthylé est transmis après réplication.

(D'après Alberts *et al.*, 2002).

al., 1981). Ce phénomène est lié à une maintenance inefficace ou à une méthylation *de novo* aberrante (Pfeifer *et al.*, 1990; Ushijima *et al.*, 2003; Wigler *et al.*, 1981). Les épimutations peuvent être engendrées par multiplication de ces erreurs. La fréquence d'apparition de telles erreurs, en culture de cellules de mammifères, semble comparable à la fréquence d'apparition spontanée de mutations géniques ($\sim 10^{-6}$) (Holliday et Ho, 2002).

Quelques épimutants célèbres sont apparus spontanément dans la nature mais la cause exacte de leur apparition reste inconnue. Le plus ancien d'entre eux est sans doute le variant *peloric* (« monstre » en grec) chez *Linaria vulgaris*, découvert par Linné il y a 250 ans sur les bords de la Baltique. Cet épimutant présente des fleurs à symétrie radiale plutôt que bilatérale (Figures I.8). Il est causé par l'inactivation du gène *LCYC*, corrélée à une forte méthylation de ce locus (Cubas *et al.*, 1999). Il correspond à une épimutation et non à une nouvelle espèce, comme Linné l'avait décrit.

V.1.2.2.2 Apparition induite par des contraintes externes

Parallèlement aux agents chimiques, certaines contraintes externes ou endogènes induisent aussi des modifications épigénétiques. Leur fréquence d'apparition est reconnue comme « plus élevée » que celle des mutations. C'est le cas épimutants *sup*, *ag* ou *fwa* au sein des lignées hypométhylées *met1* (Jacobsen *et al.*, 2000 ; Soppe *et al.*, 2000). D'après les exemples disponibles, ces changements touchent néanmoins principalement les éléments transposables (ETs), cibles premières des contrôles épigénétiques dans les génomes eucaryotes.

Une grande diversité de contraintes peut avoir un effet sur les ETs et par extension retentir sur l'activité des gènes situés à leur proximité immédiate. Les études sur le maïs, initiées avec la découverte des ETs de classe 2 (ou transposon à ADN) *Activator/Dissociator* (*Ac/Ds*), puis *Suppressor-mutator* (*Spm*) par Barbara McClintock dans les années 50, ont finalement révélé les premiers exemples d'épimutations induites par des stress externes (McClintock, 1951 ; Wessler, 1996). Dans ce cas, McClintock, et d'autres peu après, utilisèrent diverses sources de stress biotiques et abiotiques, dont les rayons UV et l'irradiation aux rayons gamma. Ils identifièrent quelques rares grains de maïs tachetés, révélateur des cycles d'activité et d'inactivité des transposons insérés dans divers gènes intervenant dans la pigmentation du grain (Walbot *et al.*, 1988; Wessler, 1996). Ces transitions d'un état à un autre sont associées à des changements de méthylation de ces éléments (Chomet *et al.*, 1987; Fedoroff *et al.*, 1989). L'obtention de protoplastes induit aussi chez le maïs la réactivation de

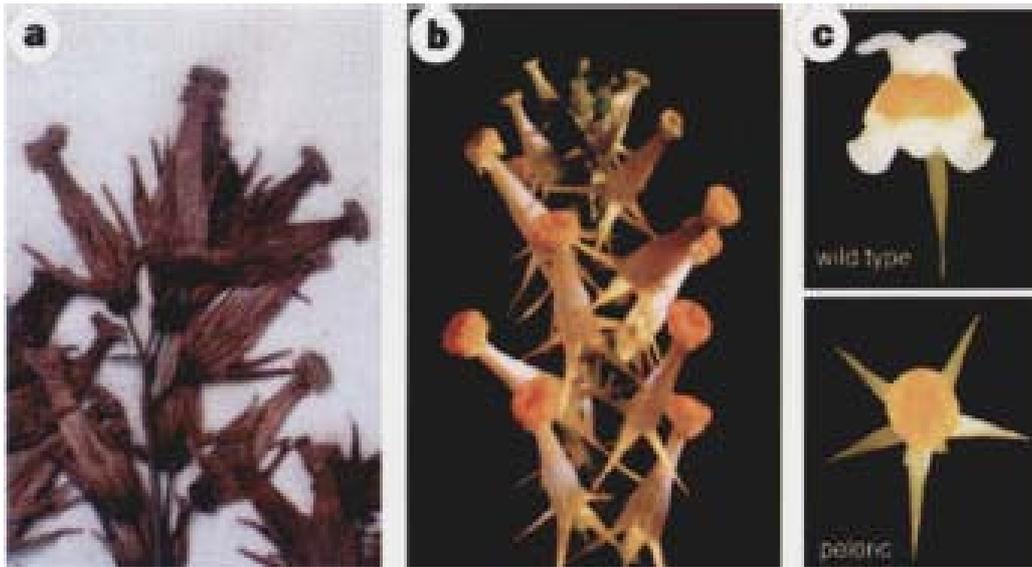


Figure I.8 : Phénotype de l'inflorescence *peloric* .

(a). Phénotype de l'inflorescence *peloric* , provenant de l'herbier original de Linné.

(b). Inflorescence d'un variant *peloric* provenant d'un spécimen actuel.

(c). Vue de face d'une fleur sauvage (symétrie bilatérale), comparée à une fleur mutante (symétrie radiale).

(D'après Cubas *et al.*, 1999).

transposons de type *Ac* et *Spm*, également révélée par l'apparition de grains tachetés (Peschke *et al.*, 1987). Chez les plantes, les rétrotransposons normalement méthylés et silencieux pour la transcription, peuvent être déméthylés et réactivés transcriptionnellement, voire mobilisés par des stress biotiques et abiotiques (comme la culture de tissus, des blessures ou les attaques de pathogènes) (Wessler *et al.*, 1996). Des exemples d'induction d'ETs par ces stress biotiques et abiotiques ont été décrits chez diverses espèces végétales telles que le tabac, le riz, le maïs et *Arabidopsis* (Grandbastien *et al.*, 1998; Walbot, 1999; Wessler *et al.*, 1996). D'après McClintock (1951), les ETs participeraient à la réponse adaptative d'un génome suite à une contrainte, à la fois via le contrôle de gènes situés à proximité et via une participation à la réorganisation du génome. La notion de contrainte englobe à la fois les contraintes biotiques et abiotiques, la culture de tissus ou les croisements entre souches d'une même espèce ou entre espèces différentes (McClintock, 1984). La transmission de ces réactivations à la génération suivante reste incertaine et dépend notamment du tissu sur lequel est appliqué le stress. L'activité de transposons à ADN de type *Mutator* (*Mu*), induite après exposition de grains de pollen aux UV, peut se transmettre à la génération suivante (Walbot, 1999).

V.1.2.2.3 Apparition induite par le développement

Enfin, l'induction d'épimutations peut se produire au cours du développement. En effet, les cellules vieillissantes en culture, ainsi que les animaux âgés, semblent en accumuler par diminution progressive du niveau général de méthylation de leur génome (Barbot *et al.*, 2002; Bestor et Tycko, 1996; Jaenisch et Bird, 2003). Avec l'âge, certains gènes de quelques tissus se méthyleraient anormalement, très souvent due à une hyperméthylation des îlots CG associés aux locus en question (Issa, 2000). Chez certains écotypes d'*Arabidopsis*, le gène clé *FLOWERING LOCUS C* (*FLC*), favorisant la floraison précoce après la vernalisation, serait sous le contrôle de telles modifications épigénétiques (Sung et Amasino, 2004 ; Bastow *et al.*, 2004).

V.1.2.3 Propriétés des épimutations

V.1.2.3.1 Ciblage et coordination

Si les mutations touchent au hasard les séquences du génome, les épimutations apparaîtraient le plus souvent dans un environnement génomique donné, en particulier à proximité de séquences répétées. Elles semblent dirigées et coordonnées. Dans le cas d'un stress environnemental, les épimutations sont fréquemment dirigées, parfois vers une famille

particulière d'ETs dont plusieurs membres répoindraient simultanément à ce même stimulus. L'apparition est alors donc bien coordonnée en différents points du génome. Plusieurs éléments de la famille de rétrotransposons *Wis2-IA*, par exemple, réagissent ensemble à un événement de polyploïdisation (Kashkush *et al.*, 2003).

La paramutation est un autre exemple d'épimutation dirigée et héritable. En 1958, Brinks identifia ce phénomène en observant une interaction entre deux allèles (Brink, 1958). L'un des deux allèles induisait le changement somatiquement et méiotiquement héritable de l'autre. Chez le maïs, ce phénomène a été très étudié pour deux gènes : *booster (b)* et *red (r)* (Figure I.9) codant des facteurs de transcription impliqués dans la synthèse des pigments de différents tissus (Brink *et al.*, 1968 ; Patterson et Chandler, 1995). L'allèle *R-r* (dit paramutable), conférant une couleur violet foncée aux graines, était modifié avec une forte fréquence en un variant épigénétique *R-r'* (graines violet clair), après mise en présence de l'allèle paramutagénique *R-stippled*, qui reste inchangé. Le phénomène est similaire pour le gène *B*. La paramutation implique une communication en *trans* entre séquences homologues. Elle fait intervenir la méthylation de l'ADN, ainsi que des changements héritablement de structure de la chromatine, probablement via des petits ARN (Chandler et Stam, 2004). Enfin, la structure des allèles paramutagéniques et paramutables semblent complexes comprenant des répétitions directes ou inversées, au locus ou à distance (Chandler et Stam, 2004).

V.1.2.3.2 Stabilité et instabilité

La stabilité des épimutations est très variable. Certaines altérations épigénétiques sont peu stables et facilement perdues. A l'inverse, d'autres le sont davantage et sont transmises pendant plusieurs générations. La réversibilité de ces altérations peut varier du tout au rien. Elle est en général spontanée, mais peut également être induite. Les exemples suivants illustrent la dépendance de la stabilité au système, à l'organisme et à la manière dont la variation est apparue et est transmise.

La variabilité de la stabilité est illustrée par les effets des insertions de transposons, supprimables dans certains cas chez le maïs en dépit de la présence continue de l'élément au site en question. Cette propriété concerne la famille *Mutator* (Martienssen et Baron, 1994), mais également d'autres éléments du maïs, tels que *Spm* (Fedoroff *et al.*, 1989) et *Ac* (Chandler et Walbot, 1986). L'élément *Spm* peut exister sous trois formes différentes : une forme active, une forme inactive ou « cryptique » et une forme instable ou « programmable », se distinguant des deux autres car pouvant « réverser » spontanément à une haute fréquence.

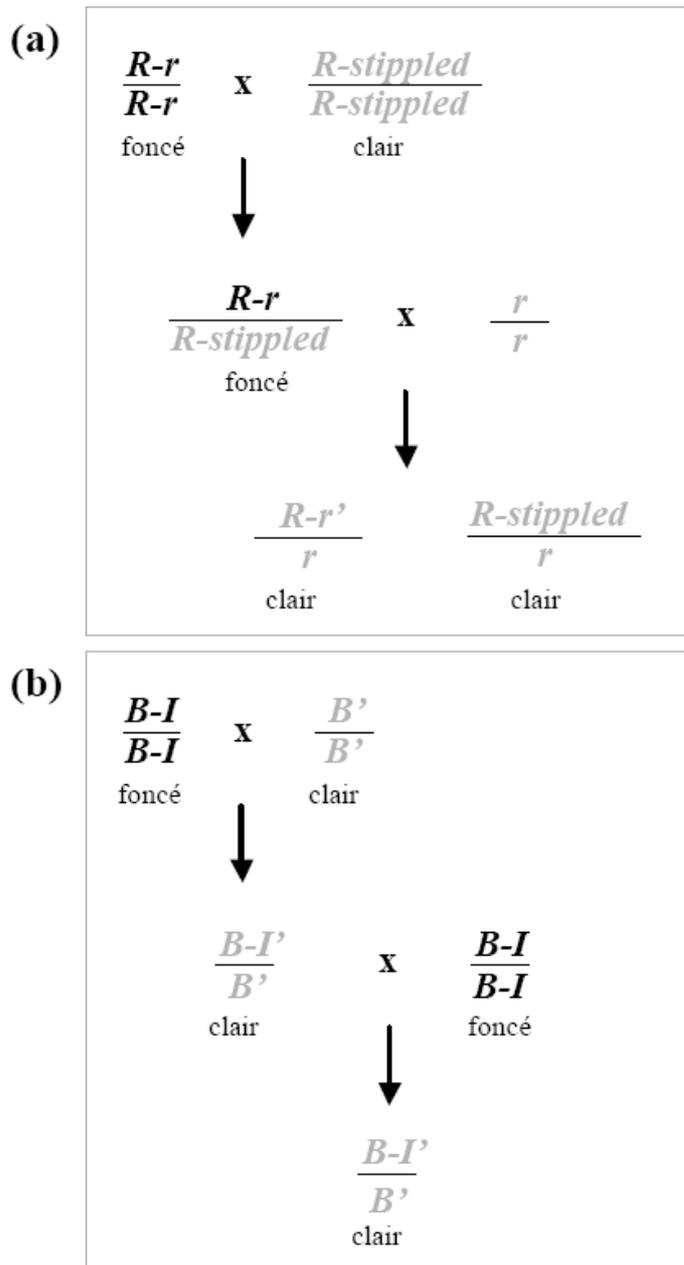


Figure I.9 : Exemples de gènes soumis au phénomène de paramutation chez le maïs.

Les phénotypes de pigmentation sont indiqués sous chaque génotype. Un allèle indiqué en “noir” est actif. Un allèle indiqué en “gris” est inactif.

(a). L’allèle R-r paramutable est inactivé par l’allèle paramutagénique R-Stippled en F2. En F1, il est exprimé dans un hétérozygote R-r/R-stippled. Quand l’hétérozygote est croisé avec un individu homozygote pour un allèle neutre r, l’allèle R-r est inactivé et devient R-r’.

(b). L’allèle B-I paramutable est inactivé par l’allèle B’ paramutagénique dès la première génération. A la génération suivante, l’allèle B-I’ inactivé devient lui-même paramutagénique et a la capacité d’inactiver un allèle B-I.

(D’après Della Vedova et Cone, 2004).

Ces trois formes présentent des profils de méthylation différents. Plus de la moitié des phénotypes mutants provoqués par insertion d'un élément de la famille *Mutator* sont supprimables, donc instables (May *et al.*, 2003).

La stabilité se caractérise également par une expressivité inhabituelle de certains épiallèles de gènes, toujours en dépit de l'absence d'hétérogénéité génétique. L'épimutation au locus *LCYC* chez *Linaria vulgaris* présente une certaine instabilité. Des branches avec des fleurs sauvages ou semi-sauvages (*semipeloric*) apparaissent à une fréquence non négligeable. Elles reflètent des événements de réversion somatique au niveau des cellules du méristème. La déméthylation complète ou partielle du gène, se transmet ensuite à tous les organes de la branche (Cubas *et al.*, 1999). Chez *Arabidopsis*, les épimutations liées à une hyperméthylation et entraînant l'inactivation transcriptionnelle d'un gène (telles que le gène *superman -sup-*) semblent plus instables que celles liées à une hypométhylation et à une activation ectopique (telles que la mutation *fwa*). Par exemple, l'épimutation *sup* présente une fréquence de réversion de l'ordre de 3% par génération (Jacobsen et Meyerowitz, 1997), alors qu'aucun événement de réversion spontanée n'a été identifié dans une population de 4 000 épimutants *fwa* (Soppe *et al.*, 2000).

La réversion spontanée peut aussi être induite par réponse à un stress externe. Le variant épigénétique *bal* chez *Arabidopsis* est apparu pour la première fois en fond génétique *ddm1* (Stokes *et al.*, 2002) (Figure I.10). Très stable en conditions normales, il devient instable après traitement chimique à l'EMS (MéthaneSulfonate d'Ethyle) ou irradiation aux rayons gamma.

Sa fréquence de réversion vers l'état sauvage est alors environ 20 fois plus élevée que celle attendue (Stokes *et al.*, 2002).

La stabilité des épimutations est aussi corrélée aux événements de réversion spontanés ou induits, se produisant à une fréquence beaucoup plus élevée que pour les mutations classiques.

V.1.2.3.3 Transmission héréditaire des épimutations

Si la plupart des variants épigénétiques sont transmissibles en mitose, le passage à travers la méiose est moins souvent observé. En premier lieu, comme pour les mutations classiques, la transmission à la génération ne pourra se produire que si l'événement initial a touché les cellules de la lignée germinale. En second lieu, le mutant doit résister aux

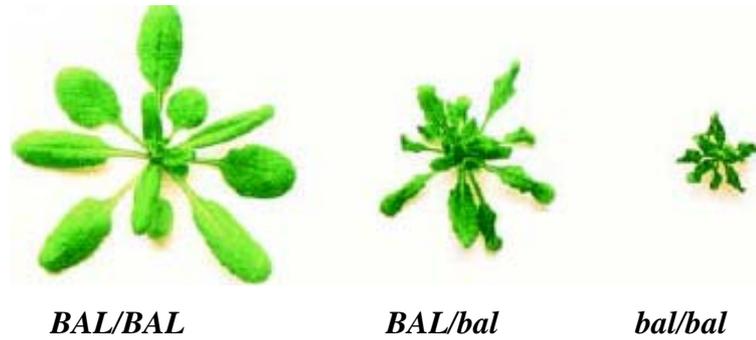


Figure I.10 : Phénotype du variant épigénétique semi-dominant *bal* chez *Arabidopsis*, apparu en contexte mutant *dml1*. (D'après Stokes *et al.*, 2002).

changements chromatinien majeurs se produisant lors de la méiose et lors du développement précoce. Chez les plantes, contrairement aux mammifères (Reik et Walter, 2001), les profils de méthylation sont maintenus pendant la méiose (Saze *et al.*, 2003). Les épimutations identifiées chez *Arabidopsis* (*fwa*, *agamous -ag-*, *sup* et *bal*) (Figure I.11) sont ainsi transmissibles par voie sexuée (Jacobsen et Meyerowitz, 1997; Jacobsen *et al.*, 2000; Kakutani *et al.*, 1999; Soppe *et al.*, 2000; Stokes *et al.*, 2002).

La génétique définit des mutations dominantes, semi-dominantes ou récessives et les profils d'héritabilité de ces mutations suivent les règles mendéliennes de ségrégation des caractères. Les profils épigénétiques des épimutations étant variables, le mode d'héritabilité, bien que mendélien, présente des distorsions de ségrégation. Par ailleurs, du fait de l'instabilité de certains épiallèles, le caractère dominant ou récessif peut être modifié.

De manière analogue aux mutations, les effets des épimutations sont à la fois quantitatifs et qualitatifs. Ils sont quantitatifs lorsque l'épimutation va affecter l'expression d'un gène, en l'augmentant ou la réduisant. Ils peuvent être qualitatifs lorsque l'épimutation supprime l'expression du gène.

V.1.3 Cas particulier des chimères

Les mutations affectant les cellules des méristèmes apicaux caulinaires revêtent des caractéristiques particulières. En effet, le méristème des dicotylédones a une structure organisée en trois assises cellulaires distinctes (Figure I.12), celui des monocotylédones étant en deux couches. La couche de cellules la plus externe formant l'épiderme est appelée couche L1, et la couche sous-jacente est la L2. Le tissu le plus interne, formé de plus d'une couche de cellules, est la L3 (Dermen, 1953 ; Neilson-Jones 1969). Les cellules d'une couche se développent indépendamment de celles des couches adjacentes. Pendant le développement de la plante, une cellule mutée dans une couche du méristème apical se divise et produit ainsi tout un secteur muté (D'Amato 1977) appelé « chimères ».

Les plantes chimériques sont classées à partir de la localisation et la proportion relative des cellules mutées par rapport aux cellules sauvages à l'intérieur du méristème apical (Tableau I.6 et figure I.13) :

- les chimères périclinales : une à deux couches cellulaires entières du méristème apical sont génétiquement distinctes des couches adjacentes (Dermen 1960 ; Jones, 1934 ; De Schepper *et al.*, 2001). Cette structure est stable et peut être maintenue par propagation végétative. Chez la vigne, le pinot gris est une chimère tissulaire naturelle : le génome de

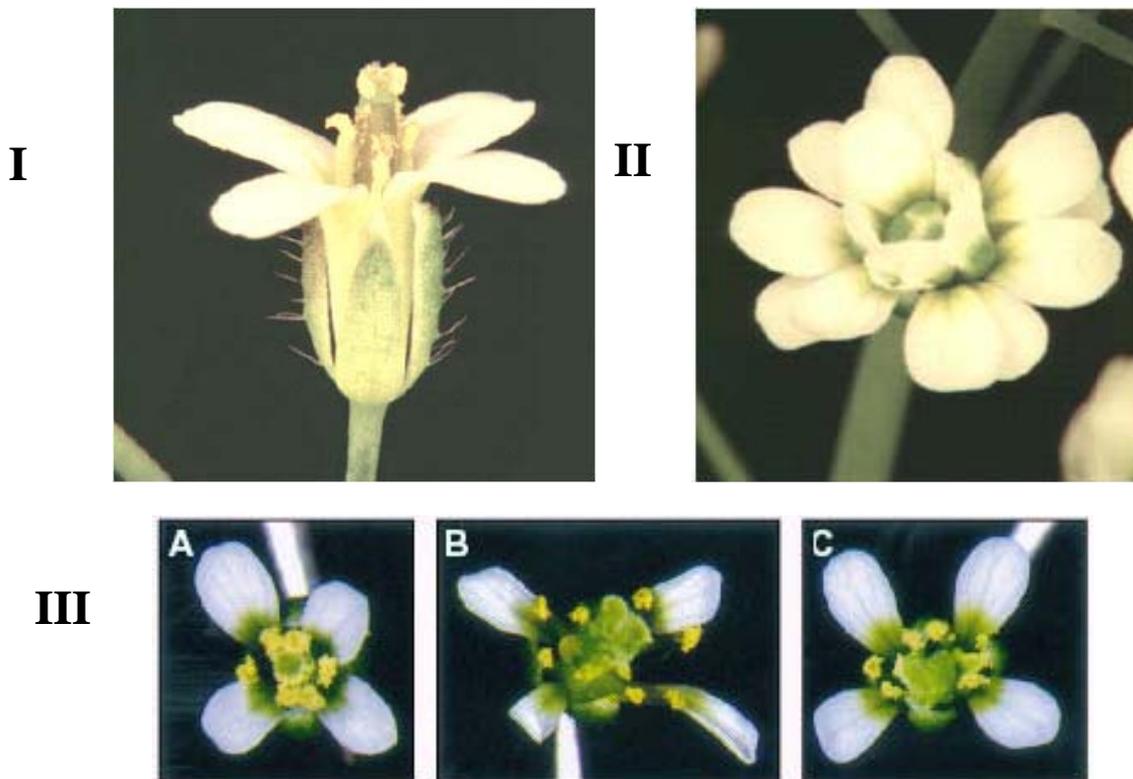


Figure I.11 : Phénotypes des épimutations *agamous* (*ag*) et *superman* (*sup*) au niveau des fleurs chez *Arabidopsis*.

(I). Fleur sauvage.

(II). L'épimutation *ag* engendre des transformations homéotiques. Les carpelles se transforment en pétales et les étamines en sépales.

(III). L'épimutation *sup* (A et B) entraîne une surproduction d'organes reproducteurs mâles, les étamines. Celles-ci sont au nombre de six sur des fleurs sauvages (C).

(D'après Coen et Meyerowitz, 1991 ; Jacobsen and Meyerowitz, 1997).

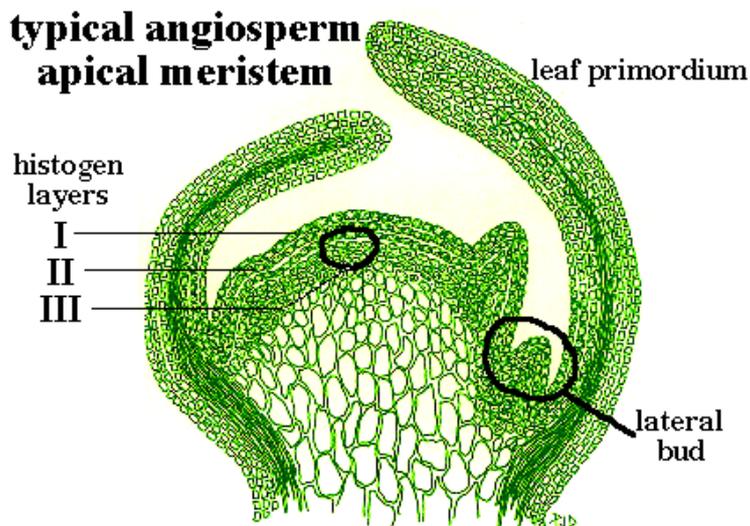


Figure I.12 : Schéma d'une coupe longitudinale d'un méristème de dicotylédone.

L'assise superficielle L1 subit des cloisonnements strictement anticlines et fournit l'épiderme et ses dépendances par différenciation ultérieure. L'assise L2 initie latéralement les feuilles par cloisonnement péricline et peut fournir une partie substantielle des tissus internes de la plante. La L3 est à l'origine des tissus centraux de la tige et des feuilles. (D'après Lineberger D., Department of Horticultural Sciences, Texas A&M University <http://aggie-horticulture.tamu.edu/tisscult/chimeras/chimeralec/chimeras.html>).

Tableau I.6 : Types de chimères possibles : trois péricleines, cinq mériclines et une sectorielle. A et B représentent deux génotypes différents. A/B signifie que dans une couche les deux génotypes sont présents.

	Périclines			Mériclines					Sectorielle
	1	2	3	1	2	3	4	5	1
L 1	A	B	B	A/B	A	A	A/B	A	A/B
L 2	B	A	B	A	A/B	A	A/B	A/B	A/B
L 3	B	B	A	A	A	A/B	A	A/B	A/B

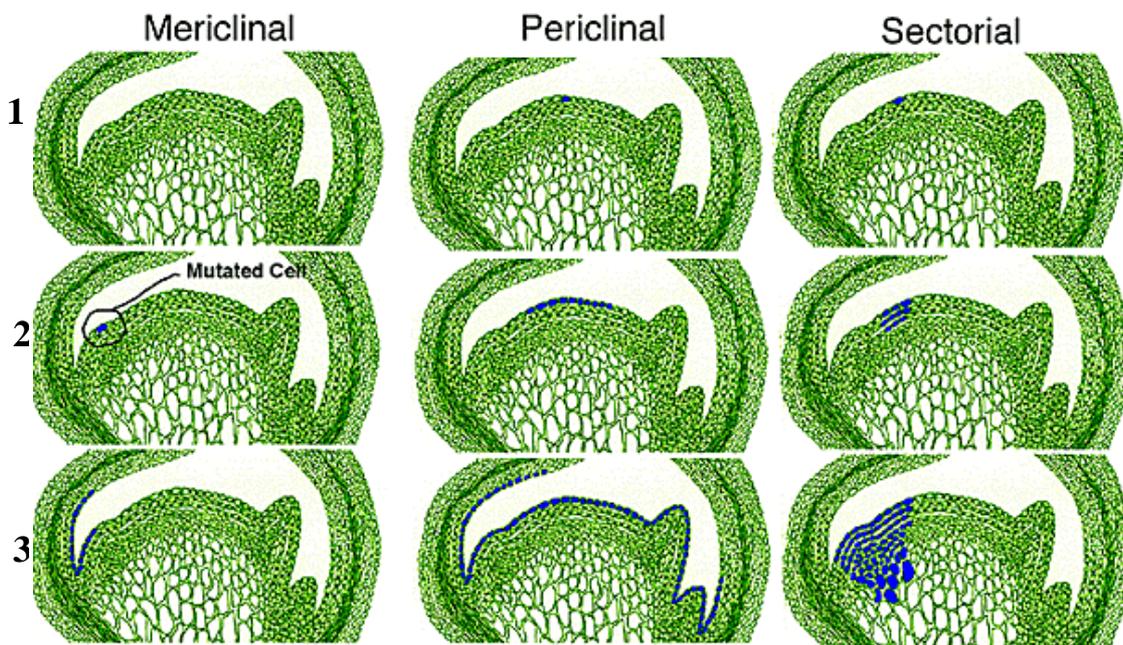


Figure I.13 : Schéma du développement (1 à 3) des différents types de chimères, méricline, péricleine et sectorielle. En bleu, la cellule mutée et les cellules qui en sont issues. (D'après Lineberger D., Department of Horticultural Sciences, Texas A&M University <http://aggie-horticulture.tamu.edu/tisscult/chimeras/chimeralec/chimeras.html>).

l'épiderme de la baie de raisin est différent de celui de la baie elle-même. Le caractère gris du pinot serait ainsi dû à des mutations génétiques survenues spontanément dans la L1 uniquement. Le génome de la plante d'origine correspondrait à un pinot blanc (Hocquigny *et al.*, 2004). Dans le cas particulier de la chimère méricline (Jorgensen et Crane, 1927), les cellules mutées ne recouvrent pas l'ensemble de la couche cellulaire. Seule la partie de la plante dérivant de cette zone mutée sera différente des autres. Comme pour les chimères périclines, ce phénomène ne touche qu'une seule assise cellulaire ;

- Les chimères sectorielles (Howell, 1998 ; Satina *et al.*, 1940) : la mutation affecte une section du méristème apical. Le génotype mutant s'étend à travers les couches cellulaires. Ce type de chimères est plus instable. Le chrysanthème de la variété 'Kasturba Gandhi' en est un exemple avec des fleurs blanches panachées de jaune.

Les manifestations des mutants chimérique peuvent être discrètes comme certaines mutations touchant la plante entière, mais aussi très visible. Ces plantes chimères ont été sélectionnées de par leur coloration particulière, leur « panachure » se caractérisant par des segments de feuilles ou de fleurs blanches (Figure I.14). De nombreuses variétés horticoles ont été ainsi sélectionnées, comme des géraniums, des roses ou encore des camélias. Baur en 1909 a découvert en premier la structure péricline des chimères panachées du géranium. D'autres mutations chimériques impliquent la disparition de certains appendices épidermiques (mûres sans épines, pêche sans duvet), l'altération de couleurs comme chez les poinsettias ou les couleurs variées de pétale ou de fleurs comme chez les œillets ou les chrysanthèmes.

Lorsque de Vries (1901) décrit ce qu'il appelle une mutation, il ne sait pas si le phénotype observé est dû à l'apparition d'un changement dans la séquence des nucléotides ou à une altération de l'état de la chromatine. Il ne fait qu'observer et interpréter un changement de phénotype, identique qu'il soit induit par une mutation ou une épimutation. Les méthodes d'étude des mutations ou d'épimutations sont donc, du moins au début, les mêmes. Dans la suite de ce manuscrit, sauf indication contraire, le terme « mutation » sera générique, regroupant les deux types de variations.

V.2 Identification, localisation et clonage de la région mutée

Lors de l'isolement d'un mutant, l'une des premières analyses à effectuer concerne la recherche de la nature de la mutation le caractérisant. Cette dernière peut provenir d'une modification du niveau de ploïdie ou d'une modification de structures des chromosomes. Dans le cas d'une absence de différence à ce niveau entre le mutant et le type « sauvage » (de



Figure I.14 : Exemple de panachure des feuilles chez l'agave (*Agave americana*).

référence), l'hypothèse d'une mutation d'origine génétique ou épigénétique peut être émise, dont il convient alors d'étudier le déterminisme génétique. Enfin, si cela est possible, la localisation sur des cartes génétiques et/ou physiques de la zone mutée permet de l'étudier plus finement mais il faut pour cela que ces cartes existent.

V.2.1 Cas du changement de ploïdie de modifications structurales de chromosomes

V.2.1.1 Identification d'un changement de ploïdie

La première conséquence de ce type de mutation concerne l'apparition d'une stérilité totale ou partielle. Jusqu'à l'arrivée des techniques d'évaluation de la taille du génome (dosage microdensitométrique de l'ADN et cytométrie en flux), la détermination du niveau de ploïdie se réalisait par comptage chromosomique sur pointes racinaires. Parallèlement, l'existence d'univalents, de trivalents et/ou de tétravalents lors de la métaphase I de la méiose permettait d'expliquer la stérilité partielle ou totale du mutant. Les méthodes actuelles comme la cytométrie donnent un indicateur rapide sur le niveau de ploïdie. Si l'hypothèse est retenue, elle doit néanmoins être confirmée de manière classique. Ce mode d'identification est particulièrement adapté lorsque la mutation est apparue dans une descendance. L'émergence d'un changement de ploïdie localisé sur un individu au niveau d'une branche ou d'une talle complique l'identification.

En effet, la formation de chimères polyploïdes à la suite d'une mutation a été observée chez de nombreuses plantes cultivées à multiplication végétative (division de souche, éclats de rhizomes, boutures, greffes, etc.). Dans ces chimères, l'une des couches cellulaires du méristème ne présente pas le même niveau de ploïdie. Selon la couche, L1, L2 ou L3, affectée, l'expression phénotypique sera plus ou moins visible. La duplication chromosomique d'un territoire de la L1 conduira à un effet visible seulement au niveau du nombre et de la taille des stomates. En revanche, le même doublement dans les couches L2 ou L3 aboutit à des fleurs modifiées et du pollen 2x ainsi qu'à des fruits, moins nombreux (stérilité partielle oblige), mais plus volumineux. Ce phénomène a bien été étudié chez le pommier (Blaser et Einset 1950 ; Dermen, 1948 ; Dermen, 1951) où l'anatomie de nombreuses variétés chimères a été interprétée en fonction de couches cellulaires diploïdes ou tétraploïdes (Blaser et Einset, 1948). Chez le datura (*Datura stramonium*), des secteurs, voire des branches complètes, tétraploïdes sont parfois identifiés sur des plantes diploïdes (Blakeslee et Belling, 1924 ; Avery *et al.*, 1959). En conséquence, une duplication de la L1 est

décelable par l'observation des stomates, de la L2 sur le pollen et de la L3 à partir de pointes racinaires.

V.2.1.2 Identification d'une aneuploïdie.

L'aneuploïdie peut apparaître par addition ou délétion d'un chromosome entier. La délétion d'un chromosome est généralement létale, sauf chez une plante auto- ou allopolyploïde. En revanche, l'addition mène à une forme trisomique, pas toujours viable, mais présentant des problèmes de stérilité. Ces mutants apparaissent occasionnellement dans les descendance de plants diploïdes⁴. L'exemple le plus connu de ce type de mutation concerne les douze mutants trisomiques de *Datura stramonium* (Blakeslee et Avery, 1919). Comme pour le changement de ploïdie, l'identification de ce genre de mutant s'effectue à partir de coupes racinaires. L'utilisation de la cytométrie peut dans certains cas permettre la mise en évidence d'une aneuploïdie.

L'identification doit se poursuivre par celle du chromosome impliqué. Ainsi, la cytogénétique a permis d'identifier, lorsque cela était possible, la nature du chromosome. Chez *Datura stramonium*, le mutant « Rolled » avec ses feuilles étroites et enroulées, ses capsules plus petites et ses épines courtes, résulte de l'addition du chromosome n°1 (Blakeslee et Belling, 1924).

Notons enfin l'existence de trisomie secondaire qui apparaît aussi spontanément et occasionnellement dans une descendance diploïde. Toujours chez *Datura stramonium*, c'est le cas du mutant nain et chétif « Polycarpic », aux feuilles étroites et lancéolées et donnant des capsules encore plus petites que chez le « Rolled ». Ici, le chromosome additionnel est constitué de deux fois le même bras du chromosome n°1.

Actuellement, la cytogénétique moléculaire aboutit à l'identification chromosomique lorsque le caryogramme n'a pu être classiquement établi. Par exemple, l'hybridation *in situ* peut servir à marquer les chromosomes porteurs de d'ARN ribosomique (5S, 18S et 26S) (Murata *et al.*, 1990 ; Leitch et Heslop-Harrison, 1992 ; Maluszynska *et al.*, 1993 ; D'Hont *et al.*, 2000 ; D'Hont *et al.*, 1996 ; Yamamoto et Mukai, 1995).

⁴ D'autres origines existent pour la trisomie, comme l'apparition dans une descendance de triploïde, mais ne sont pas considérées ici comme aboutissant à un mutant naturel, même si leur phénotype est le même.

V.2.1.3 Identification et localisation d'une translocation ou d'une inversion

Les translocations chromosomiques spontanées ont été bien décrites chez l'orge (*Hordeum spontaneum* C. Hoch) (Konishi et Linde-Laursen, 1987). Sept lignées sur 1360 possèdent ce type de mutations : les cinq premières ont leur points de translocations situés sur les centromères des chromosomes 2 et 4, tandis que ceux de la sixième sont localisés sur les bras longs des chromosomes 3 et 6. Enfin, pour la septième, ils concernent les bras des chromosomes 3 et 7, avec de surcroît, une inversion de séquence sur le petit bras du chromosome 7.

Deux types d'inversions chromosomiques sont connus : les inversions péricentriques où le centromère est inclus dans le segment concerné et les inversions paracentriques qui ne renferment pas le centromère. (Muller, 1940). C'est l'établissement de cartes génétiques montrant un changement dans l'ordre des gènes qui a mis en évidence de telles mutations. Il y a aussi chez l'hétérozygote un déficit de recombinaisons. Les premières informations cytologiques recueillies lors de l'appariement chromosomique en méiose (stade pachytène) ont été obtenues chez le maïs par McClintock (1931, 1933). Enfin, la technique du *C-banding* a été utilisée avec succès pour la mise en évidence de deux translocations réciproques impliquant les bras 4AL, 5AL et 7BS chez l'hybride blé-seigle (Naranjo *et al.*, 1987).

Actuellement, les techniques d'hybridation *in situ* avec des sondes RFLP (Anderson *et al.*, 1992 ; Liu *et al.*, 1992 ; Jacobsen *et al.*, 1995 ; Islam-Faridi *et al.*, 2002 ; Ha *et al.*, 2002) sont susceptibles d'apporter sur la carte physique la preuve d'une inversion ou d'une translocation.

V.2.2 Cas des mutations génétiques et épigénétiques

Deux grandes classes peuvent être définies selon que la mutation affecte un caractère à déterminisme génétique simple ou à déterminisme polygénique.

V.2.2.1 Identification et localisation des mutations à déterminisme génétique simple

La distribution du caractère dans une descendance issue du croisement entre le mutant et le type sauvage permet dans un premier temps de distinguer une variation discontinue d'une variation continue. Une variation discontinue ou discrète correspond à une classification totale dans un nombre limité de classes du caractère mutant. Le plus souvent,

deux à trois classes sont observées dans une descendance et n'entraînent pas d'ambiguïté dans la classification des différents phénotypes.

Trois types de mutations à déterminisme génétique simple sont définis : les mutations nucléaires, les mutations cytoplasmiques et les mutations nucléocytoplasmiques. Elles sont identifiées d'après leur hérédité en croisement.

Lors d'une mutation d'origine nucléaire, il n'y a pas de différence entre le croisement « muté x sauvage » et « sauvage x muté ». L'identification se poursuit par une analyse génétique basée sur les lois de Mendel. L'homozygotie ou l'hétérozygotie du mutant est ainsi déterminée, ainsi que sa nature dominante, co-dominante ou récessive. L'étape suivante consiste à localiser la mutation sur la carte génétique lorsque cette dernière existe.

Enfin, lorsque plusieurs mutants affectent le même caractère, les différentes mutations peuvent appartenir à une série allélique d'un même locus. Un tel exemple avec trois allèles au locus « y » respectivement Y (rouge), y^0 (orange) et y (jaune) a ainsi été observé pour la coloration de la chair de la pastèque (*Citrullus lanatus*) (Henderson *et al.*, 1998). Elles peuvent aussi être des allèles de locus différents. La carte génétique est susceptible d'apporter une réponse dans la mesure où elle existe. Dans tous les cas, la présence de recombinants mène à accepter l'hypothèse multilocus. Le niveau de résolution constitue alors la principale limite à ce type d'identification. Il dépend de la taille de la descendance et de la fréquence de *crossing over* dans la zone du génome comprenant les deux mutations. Enfin, les hypothèses multilocus et multiallélisme ne sont pas exclusives et une série de mutants peut se scinder en deux séries multialléliques, chacune appartenant à un locus donné.

Dans tous les cas, la seule façon de trancher consiste à isoler le ou les loci et démontrer leurs effets distincts. La liaison génétique chez la tomate entre un mutant de maturation *rin* (« *ripening inhibitor* ») et le phénotype macrocalyx de la fleur touchant les sépales de la fleur n'avait jamais pu être mise en défaut. Ces deux phénotypes correspondent pourtant bien à deux gènes physiquement et génétiquement très liés mais distincts, comme l'ont montré un clonage des loci et leur transformation génétique (Tanksley *et al.*, 1992).

Une fois l'hypothèse multilocus mise en évidence, les interactions entre les différents locus restent à tester. Lorsqu'un locus masque totalement l'effet d'un autre, on parle d'épistasie. Dans ce cas, l'interprétation biologique la plus courante est le positionnement du locus épistatique en amont dans la chaîne métabolique du caractère étudié. En réalisant les différents tests d'épistasie pour l'ensemble des locus mutés mis en évidence, chacune des

mutations peut être ordonnée par rapport aux autres. Par exemple, le grand nombre de mutants d'*Arabidopsis* pour la réponse à l'éthylène a permis d'étudier le mécanisme biologique de biosynthèse, transduction et réponse du signal éthylène (Guzman et Ecker, 1990). Grâce à la construction de doubles mutants : 1) l'établissement de l'ordre de ETR1 vers HSL1, correspondant au mutant le plus en aval de la chaîne de réponse/transduction à l'éthylène, a été obtenu (Ecker, 1995) ; 2) un phénotype additif des mutants récessifs pour les différents loci codant des récepteurs à l'éthylène a été démontré (Hua et Meyerowitz, 1998).

Les mutations cytoplasmiques sont mises en évidence par la présence d'une différence entre croisements directs et réciproques. Elles peuvent être d'origine mitochondriale ou chloroplastique. Les plus connues concernent les mutants déficients chlorophylliens, léthaux, (Murray et Kohorn, 1991 ; Hess *et al.*, 2005) sauf chez les chimères.

Les mutations nucléocytoplasmiques font apparaître des modes d'hérédité avec ségrégation non-mendélienne (présence de distorsions de ségrégation) associée à une dissymétrie entre croisements directs et réciproques. La plus connue concernent la stérilité mâle (Owen, 1942 ; Belhassen *et al.*, 1991), mais elles incluent aussi certaines chimères chlorophylliennes maintenues de génération en génération.

V.2.2.2 Identification et localisation des mutations à effets quantitatifs

Lorsque l'expression phénotypique résulte de l'effet de plusieurs gènes, la distribution de la descendance pour le caractère se caractérise par un continuum de classes. Le repérage du mutant dans une descendance nécessite alors un effet important de la mutation sur le phénotype par rapport à la variation polygénique naturelle et celle induite par l'environnement. Pour résumer, une mutation à effet quantitatif sera d'autant plus facilement repérée que les parents sont homozygotes pour l'ensemble des gènes intervenant dans le phénotype du caractère et que le caractère concerné est hautement héritable au sens large.

La mutation étant repérée, son identification commence. Comme pour les caractères qualitatifs, les croisements directs et réciproques entre le mutant et la forme sauvage vont apporter les premiers éléments de réponse, à savoir l'impact en terme de variance sur la variance phénotypique et sur la variance génétique.

La localisation sur la carte génétique lorsqu'elle existe constitue l'étape suivante. Il s'agit dans un premier temps de déterminer le nombre de locus dont les effets expliquent la très grande partie de la variation d'origine génétique. Ainsi, la recherche des liaisons entre les marqueurs génétiques cartographiés et le caractère quantitatif conduit à mettre en évidence

des zones du génome impliqués dans la variation du caractère (QTLs) (Darvasi *et al.*, 1993 ; Lander et Bostein, 1989 ; Lander et Schork, 1994 ; Patterson *et al.*, 1988). Un exemple historique concerne la liaison entre la couleur et le poids de la graine chez le haricot, *Phaseolus vulgaris* (Sax, 1923). La couleur de la graine est contrôlée par un seul locus avec deux allèles - P et p - alors que le poids de la graine est un caractère typiquement quantitatif. Parmi la population F2 issue du croisement de deux lignées de haricot, les graines avec un génotype PP et Pp ont un poids de 4,3 +/- 0,8gr et 1,9 +/- 0,6gr plus important que les graines pp. Un gène à effet quantitatif pour le caractère poids est ainsi lié génétiquement à l'allèle P contrôlant la couleur de la graine (interprétation biologique du résultat). La corrélation statistique (caractère P/p et une variable quantitative) est alors interprétée comme une liaison génétique.

Lorsque plusieurs mutations à effet quantitatif sur un caractère donné ont été mises en évidence, il convient de poursuivre en recherchant d'éventuelles relations d'épistasie. L'effet global de deux QTL vaut normalement théoriquement la somme des effets de chacun des deux. L'écart à cette valeur attendue correspond au phénomène d'épistasie entre QTLs. Tester ce phénomène entre QTLs de différents fonds génétiques est possible grâce à des constructions génétiques subtiles. Il s'agit dans un premier temps d'isoler chaque QTL dans un même fond génétique de façon à ce que seul ce QTL soit responsable des variations du caractère. L'épistasie est alors testée comme effet statistique en croisant les plantes ayant chacune leur QTL isolé deux à deux. Un exemple est donné par les *IL* (*Introgressed Lines*) de tomate (Eshed et Zamir, 1996 ; Liu et Zamir, 1999). Chaque lignée d'introgression de la population correspond à une lignée contenant un court segment (en moyenne 30cM) de *Lycopersicon pennelli* L. dans *L. esculentum*. Un plan de croisement diallèle avec dix lignées d'introgression a été utilisé. 28% des interactions ont été mis en évidence comme étant épistatiques, c'est-à-dire déviant par rapport à la situation d'additivité complète (Eshed et Zamir, 1996). Une relation épistatique entre deux QTLs impliqués dans les différences architecturales entre le maïs et la téosinte a été mise en évidence à l'aide de la construction de lignées quasi-isogéniques (Doebley *et al.*, 1995). Une première étude effectuée sur des populations F2 avait suggéré, sans le prouver réellement, l'existence d'une telle relation épistatique. La construction de lignées quasi-isogéniques pour ces deux QTLs a réduit l'effets d'autres QTL (Doebley et Stec, 1993) et a mis en évidence la forte interaction épistatique entre ces deux QTLs.

V.2.2.3 Cas des caractères dont l'expression est gouvernée à la fois par des gènes à contrôle génétique simple et complexe

Pour un caractère donné, il est possible de trouver à la fois des mutants à contrôle génétique simple et complexe. La hauteur de la plante est chez le maïs un exemple classique où co-existent à la fois des gènes majeurs et des gènes à effets quantitatifs (*Quantitative Trait Loci* ou QTLs). A partir de quatre descendances F2 de cette plante, Beavis *et al.* (1991) ont mis en évidence 16 QTLs. Douze d'entre-eux sont localisés à moins de 10 cM d'une mutation qualitative affectant aussi la hauteur, mais différente d'un QTL à l'autre.

Ainsi, la distinction de principe entre variation discrète et continue, peut masquer une origine moléculaire commune. En d'autres termes, l'origine de la variation, c'est-à-dire le polymorphisme dans la séquence d'un gène, est la même (Robertson, 1989), seule diffère la variance de l'effet sur le phénotype. Récemment, le clonage positionnel de plusieurs QTLs a confirmé ce postulat de l'origine commune. Ainsi, le QTL de tomate Brix9-2-5 pour la teneur en matière sèche a pour origine une variation de longueur d'une séquence répétée dans la séquence intronique d'une invertase apoplastique (Fridman *et al.*, 2000). Des mutations qualitatives sont connues par ailleurs chez la tomate dans cette famille multigénique. De même, le gène majeur *sucr*, influençant le rapport glucose/fructose, correspond à une mutation dans une Invertase acide Vacuolaire (Chetelat *et al.*, 1993 ; Elliot *et al.*, 1993 ; Sato *et al.*, 1993). A la suite du clonage et la complémentation (cf. chapitre I.2.3.3) du QTL *fw2.2* chez la tomate, la variation d'expression du gène ORFX, présentant une homologie avec les *ras* protéines, est apparue responsable de variations quantitatives dans le poids du fruit (Alpert *et al.*, 1995 ; Frary *et al.*, 2000).

V.2.3 Localisation fine et identification moléculaire de la mutation

V.2.3.1 Localisation fine de la mutation

La localisation fine de la mutation consiste à densifier la région de la carte génétique où se localise le locus muté, c.a.d. à rechercher des marqueurs génétiques très liés au locus. Plusieurs techniques peuvent être appliquées (article de synthèse Peters *et al.*, 2003). Certaines nécessitent un matériel génétique pré-existant, carte génétique saturée ou lignées quasi-isogéniques, d'autres sont d'application plus générale comme la Bulk Segregant Analysis (BSA). Dans ce dernier cas, l'ADN d'individus ayant le même phénotype est mélangé pour former un *bulk*. Deux *bulks* sont ainsi créés, l'un pour le mutant, l'autre pour le sauvage (Figure I.15). Les marqueurs différenciant ces deux *Bulks* sont recherchés et

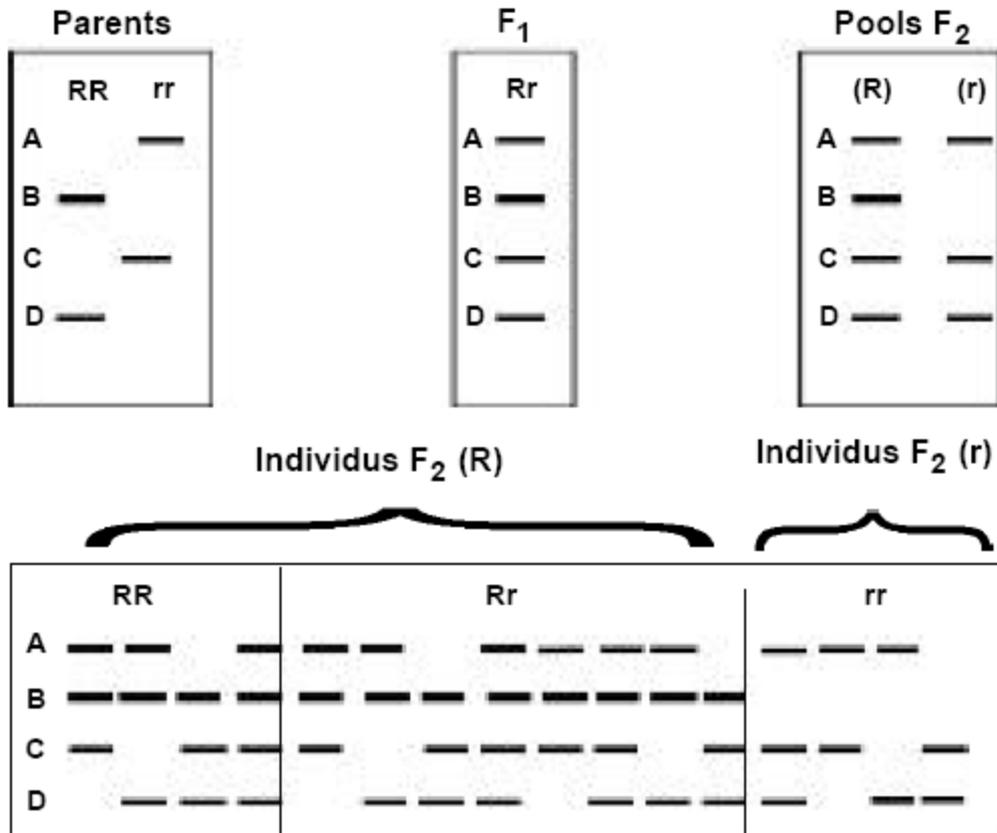


Figure I.15 : Principe de la méthode BSA appliquée sur une population F₂ en ségrégation pour le gène de résistance R/sensibilité r (Michelmore *et al.*, 1991). La bande épaisse correspond au locus dominant lié à l'allèle de résistance.

cartographiés. Génétiquement, l'utilisation de la BSA est équivalente à l'utilisation des lignées quasi-isogéniques, mais d'application beaucoup plus générale. Il suffit en effet d'une seule population en ségrégation pour constituer les *bulks*. Décrite pour la première fois par Michelmore (Michelmore *et al.*, 1991), elle a rendu d'innombrables services pour densifier en marqueurs une zone du génome contenant un gène d'intérêt.

V.2.3.2 Identification moléculaire de la mutation

Une fois la région mutée finement cartographiée, plusieurs méthodes ont été mises en place pour isoler par clonage le gène muté et le séquencer.

V.2.3.2.1 Approche gène-candidat

Lorsqu'un gène dont la séquence nucléotidique est disponible et la fonction physiologique connue, il devient un gène-candidat potentiel. Des sondes peuvent être dessinées permettant la définition d'un nouveau marqueur cartographiable. Leur co-ségrégation avec la mutation peut alors être testée (Causse *et al.*, 1995 ; Prioul *et al.*, 1999). Cette approche suppose :

- l'existence connue de gènes séquencés supposés impliqués dans le caractère étudié et une bonne connaissance de la physiologie de ce dernier;
- la localisation fine sur une carte génétique commune des sondes moléculaires candidates et des loci variants. Une extrême prudence est de mise lorsqu'une coségrégation est découverte. En particulier pour les QTLs, la faible précision de leur cartographie conjuguée à l'existence de plusieurs QTLs augmente la probabilité d'observer cette coségrégation seulement par le fait du hasard.

Plusieurs exemples d'identification fine de locus mutés par une approche gène-candidat peuvent être cités. Chez la tomate, cette approche a permis d'identifier la plupart des gènes impliqués dans la maturation (exemples Yen *et al.*, 1995 ; Mustilli *et al.*, 1999), la couleur de chair (exemples Ronen *et al.*, 1999 ; Lefebvre *et al.*, 1998 ; Deng et Davis, 1999) et sa sucrosité (exemple Chetelat *et al.*, 1993) (Tableau I.7). De même, les séquences disponibles de gènes contrôlant la floraison chez *Medicago truncatula* et chez *Arabidopsis* ont été utilisées pour identifier leurs gènes homologues chez le pois. Cette approche gène candidat a ainsi permis d'isoler par clonage le gène *LF*, un des gènes majeurs impliqués dans précocité de floraison chez le pois (Foucher *et al.*, 2003).

En raison des difficultés techniques liés au clonage positionnel des QTLs et parallèlement à l'augmentation exponentielle du nombre de séquence exprimées (Expressed

Tableau I.7 : Quelques exemples d'identification de loci pour des gènes impliqués dans la maturation, le développement ou la qualité des fruits charnus par une approche gène-candidat. Les loci *Del* et *y* de la tomate et du pigment codent respectivement une Lycopène cyclase ϵ et une capsantine capsorubine synthase. Ces deux gènes présentent une identité de 55% et confirme l'intérêt d'une approche gène-candidat à l'aide de sonde hétérologue.

Phénotype	Locus	Gène candidat	Espèces source	Référence
Maturation				
	Nr (Never ripe)	ETR1 (recepteur éthylène)	<i>A. thaliana</i>	Yen <i>et al.</i> , 1995
	<i>Hyp-2</i> (high pigment-2)	DEETIOLATED	<i>A. thaliana</i>	Mustilli <i>et al.</i> , 1999
Couleur de la chair				
	<i>B/Del</i> (Delta)	Lycopene cyclase ϵ	<i>L. esculentum</i>	Ronen <i>et al.</i> , 1999
	<i>Y</i>	Capsantine Capsorubine synthase (CCS)	<i>C. annuum</i>	Lefebvre <i>et al.</i> , 1998
	<i>r</i>	Phytoene synthase (TOM5)	<i>L. esculentum</i>	Kinzer <i>et al.</i> , 1990
	<i>c</i>	Flavone-3 hydroxylase	<i>F. vesca</i>	Deng et Davis, 1999
Sucrosité				
	<i>sucr</i>	Invertase acide	<i>L. esculentum</i>	Chetelat <i>et al.</i> , 1993

Sequence Tag ou ESTs) déposées régulièrement dans les bases de données, cette approche est intensivement utilisée chez les végétaux. Ainsi, un grand nombre d'ESTs présentant des homologies de séquences avec des gènes de résistance d'*Arabidopsis thaliana* et de la tomate ont été mis en évidence et les gènes correspondants cartographiés, formant des clusters (Pan *et al.*, 2000). Ils sont susceptibles de servir de gènes-candidats lors d'étude sur la résistance au pathogènes chez d'autres végétaux. Chez le maïs (Causse *et al.*, 1996 ; Davis *et al.*, 1999) comme chez le riz (Harushima *et al.*, 1998), il existe des cartes génétiques à très haute densité composées principalement de marqueurs RFLP produits à l'aide d'ESTs. Elles fournissent autant de gènes candidats pour les futures études.

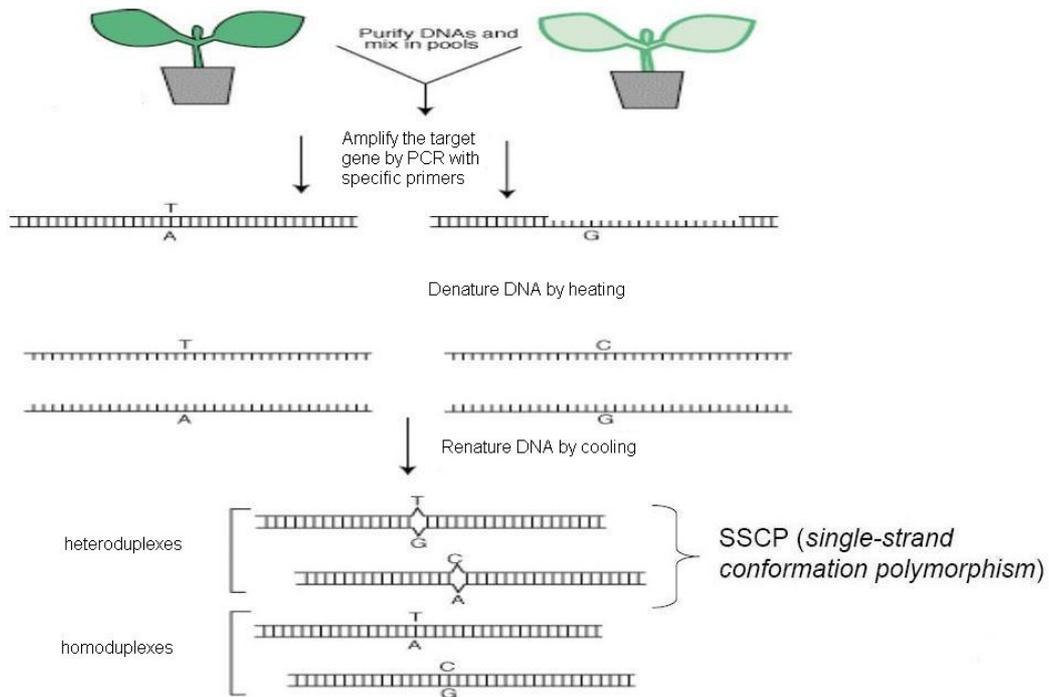
V.2.3.2.2 Isolement par clonage de la zone mutée à partir d'une partie de séquence d'ADN connue

Si une séquence d'ADN a été isolée ou si elle est un bon candidat pour le gène muté, certaines techniques permettent d'en obtenir la séquence complète.

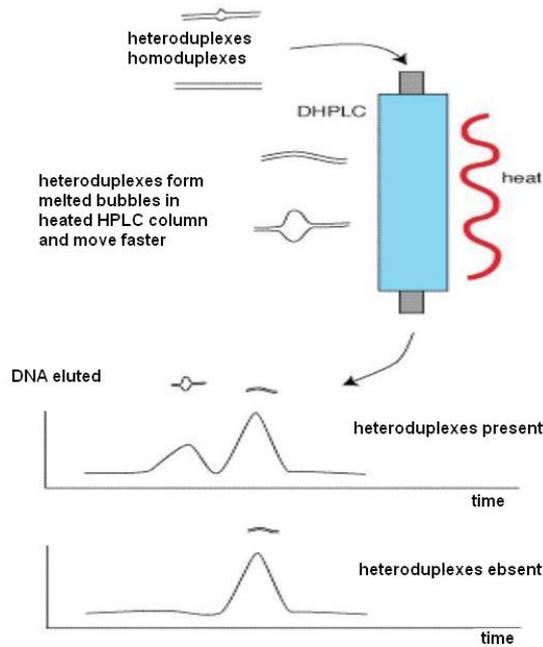
La marche génomique par PCR (Polymerase Chain Reaction) aboutit au clonage des séquences génomiques flanquant une séquence d'ADN connue. Elle est utilisée par exemple dans le cas d'un gène étiqueté par un transposon ou un marqueur, ou encore pour cloner le promoteur d'un gène dont on ne possède que l'ADNc. Cette technique permet de caractériser aussi bien la séquence située en amont (5'-P) que la séquence située en aval (3'-OH) de la séquence connue. C'est une approche souvent rapide, très sensible, spécifique et qui nécessite peu d'ADN génomique. Elle présente l'avantage de pouvoir travailler à partir de l'ADN d'un individu (par exemple un mutant) pour lequel une banque génomique n'est pas toujours disponible.

Une variante du *tilling* (Targeted Induced Lesions IN Genome) (McCallum *et al.*, 2000) a aussi été développée pour rechercher la mutation dans un gène-candidat. Elle permet d'analyser le polymorphisme allélique : l'*ecotilling*. Le criblage mis en place pour le *tilling* utilise l'analyse des hétéroduplex par DHPLC (Denaturing High-Performance Liquid Chromatography) (McCallum *et al.*, 2000) (Figure I.16). Les ADNs d'une collection de plantes sont mélangés, amplifiés par PCR à l'aide d'amorces spécifiques du gène d'intérêt et la DHPLC détecte les mésappariements dans les hétéroduplex créés par dénaturation-renaturation. Ces mésappariements sont visualisés sous la forme d'un pic supplémentaire sur le chromatogramme. Cette technique a l'avantage d'être utilisable sur tous les organismes, elle ne nécessite pas d'introduction d'ADN étranger et elle minimise les efforts nécessaires pour trouver une mutation. Une collection de 10 000 plantes d'*Arabidopsis thaliana* serait

A



Option 1: DHPLC



Option 2: Mismatch-specific restriction enzyme, e.g. *CEL1*

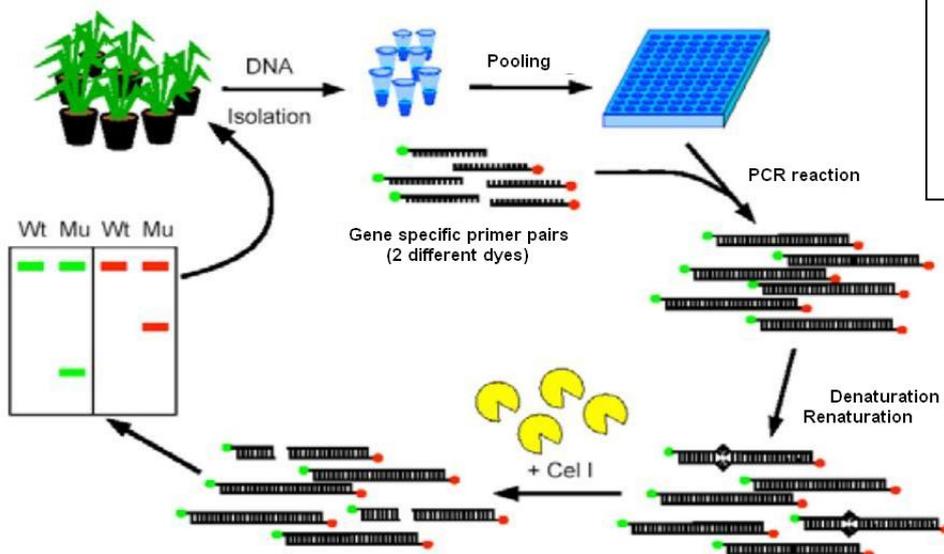


Figure I.16 : Technique de l'Écotilling (Mc Callum *et al.*, 2000)

A) Formation des homoduplexes ou des hétéroduplex (synonymes de mutation ponctuelle)

Lors de l'appariement (*annealing*), les heteroduplex peuvent être reconnus :

Option 1) par Denaturing High-Performance Liquid chromatography (DHPLC).

Option 2) par une enzyme de restriction reconnaissant les heteroduplexes, *CEL 1* par exemple. Le polymorphisme de longueur est alors visualisé après migration sur gel d'accrylamide.

suffisante pour identifier une mutation avec un seul couple d'amorces. Cette technologie a été mise en oeuvre chez *Arabidopsis*, le pois, la tomate et le blé. Elle est beaucoup moins onéreuse à mettre en oeuvre que le séquençage d'allèles pour rechercher du polymorphisme. Elle permet par exemple d'améliorer un caractère agronomique, identifié à partir d'un mutant, sans recours systématique au génie génétique.

V.2.3.2.3 Isolement par clonage de la région mutée sans connaissance de sa séquence

En l'absence de système d'étiquetage, comme un gène-candidat, la stratégie la plus couramment utilisée est le clonage positionnel. Jusqu'aux années 1990, peu d'outils étaient disponibles pour isoler les gènes repérés par des approches génétiques, surtout en l'absence d'informations très précises sur les caractéristiques biochimiques du processus étudié. Toutefois les approches de clonage positionnel disponibles aujourd'hui ont fait de grands progrès. Elles tirent parti des outils développés au cours de la dernière décennie : marqueurs moléculaires, clonage de grands fragments, etc. Les gènes repérés par mutation peuvent être isolés uniquement sur la base de leur position génétique, et en l'absence d'informations sur la fonction biochimique de la protéine correspondante. Cependant, ces approches demeurent, encore aujourd'hui, délicates et particulièrement lourdes à mettre en oeuvre. En particulier, elles nécessitent de construire des grandes populations en ségrégation afin d'assurer un positionnement génétique précis. Elles sont néanmoins théoriquement applicables dans n'importe quelle espèce où il est possible de réaliser la cartographie génétique et physique.

Ce type de clonage repose sur l'identification de marqueurs ADN et d'événements de recombinaison dans la région du locus cible. Dans une première étape, les marqueurs sont positionnés avec précision par rapport aux événements de recombinaison pour développer une carte génétique de haute résolution. La seconde étape consiste alors à construire une carte physique de la région, dans laquelle les distances génétiques sont converties en nombre de paires de bases. La construction d'une banque d'ADN génomique est une étape essentielle pour l'établissement de la carte physique. Le système BAC (Bacterial Artificial Chromosome) (Shizuya *et al.*, 1992) est le plus couramment utilisé pour ce type d'approche. La taille des inserts peut y atteindre 350kb. La banque BAC est criblée avec les marqueurs les plus proches du gène d'intérêt. Une carte locale des clones est établie ensuite par une série de digestions enzymatiques permettant de définir les fragments communs à plusieurs clones et de les ordonner les uns par rapports aux autres. Un ensemble de clones ordonnés constitue un contig. La réussite de la construction de la carte physique dépend de la qualité de la carte génétique du locus cible. Les extrémités des BAC sont séquencées et de nouveaux marqueurs sont

définis et utilisés pour ancrer la carte génétique à la carte physique et pour identifier le clone BAC supposé porter le gène d'intérêt, ou encore pour allonger la taille des contigs. Quand le clone BAC recouvrant l'intervalle entre les marqueurs les plus proches a été identifié, le gène cible peut être séquencé. Le polymorphisme des portions codantes est analysé afin de trouver d'éventuelles relations entre polymorphisme et variation du caractère.

L'utilité du clonage positionnel dans l'identification de mutation naturelle peut être illustré par l'étude sur le mutant *evergrowing* (EVG) de la pêche (*Prunus persica*). C'est l'un des deux mutants identifiés chez les ligneux comme impliqué dans la dormance hivernale. La mutation EVG est monocus et récessive. Un contig autour de la région a pu être assemblé grâce à des séquences de BAC et à une carte génétique fine de la région mutée. Une *MADS box* codant un cadre ouvert de lecture (ORF) a ainsi été trouvée dans un des clones BAC de ce contig et a été utilisée comme sonde (Bielenberg *et al.*, 2004). Elle a servi à détecter une différence de séquence entre le sauvage et le mutant EVG, due à une délétion.

Le clonage d'un QTL est plus difficile car il n'influence que partiellement la variation du caractère. La stratégie actuellement retenue consiste à « mendéliser » les QTLs avant l'établissement du clonage positionnel. Le premier objectif est d'isoler un QTL dans un fond génétique où il est seul en ségrégation, par la construction de lignées quasi-isogéniques. Trois QTLs pour la date de floraison chez le riz, *Hd-1*, *Hd-2* et *Hd-3* ont ainsi été isolés, puis *Hd-1* a été mendélisé par la construction de lignées de substitutions BC3F2 et BC3F3, en testant la descendance de chaque lignée (Yamamoto *et al.*, 1998). Le locus *Hd-1* a finalement été cloné en utilisant une méthodologie par la suite plus classique (Yano *et al.*, 2000).

Chez *Arabidopsis thaliana* possédant un petit génome, cette stratégie a largement été utilisée pour cloner les gènes affectés par les mutations. Plusieurs d'entre eux, impliqués dans les teneurs en acide gras des graines, ont ainsi été isolés par clonage positionnel. La mutation *fad3*, caractérisée par une teneur faible en acide gras 18:3, est localisée à 0,4 et 2cM de marqueurs RFLP. Ces derniers ont permis de positionner des clones YAC (Yeast Artificial Chromosome) couvrant l'intégralité de cette région. Les clones YAC ont ensuite été utilisés comme sonde pour hybrider une banque d'ADNc. Un des gènes de cette région génomique, correspondant au gène $\Delta 15$ -desaturase, s'est avéré être un bon candidat pour correspondre au gène muté. L'hypothèse a enfin été validée par la complémentation (voir chapitre suivant) de la mutation *fad3* par l'ADNc $\Delta 15$ -desaturase (Arondel *et al.*, 1992). Une stratégie analogue a été utilisée avec succès pour la mutation *fad7* d'*Arabidopsis thaliana*, induisant, elle aussi, une teneur faible en acide gras 18:3 (Iba *et al.*, 1993).

V.2.3.3 Validation de la région isolée comme étant la mutation recherchée

La caractérisation d'une mutation par clonage et séquençage aboutit à la comparaison de sa séquence avec celles accumulées dans les banques de données internationales. Dans certains cas, la séquence identifiée présente des similitudes avec un gène d'un autre organisme codant une protéine de fonction connue. Dans d'autres cas, la séquence étudiée ne présente aucune similitude et la fonction reste indéterminée. Dans ces deux types de situation, il est nécessaire soit de démontrer expérimentalement la fonction biologique identifiée par similarité, soit de créer un individu déficient dans la fonction du gène non identifié ou alors d'en compléter un. En d'autres termes, le rôle du gène doit être confirmé ou déterminé, et par la même occasion ces études aboutissent à prouver son implication dans le mécanisme de la mutation. Pour ce faire, la comparaison de l'expression du gène chez le mutant et le sauvage peut aussi fournir des renseignements sur le mécanisme d'action de la mutation.

V.2.3.3.1 Complémentation fonctionnelle de l'expression

Des constructions plasmidiques, porteuses des régions (portions de BAC par exemple) isolées à la suite du clonage positionnel, sont produites et utilisées pour transformer des plantes mutantes. Le mutant est complété par la séquence génomique sauvage correspondante, validant ainsi par «complémentation» son rôle dans la variation du caractère. *A priori*, cette technique peut s'appliquer aux QTLs. Le premier succès de complémentation fonctionnelle d'une allèle quantitatif a été obtenu sur le QTL *fw.2.2* du poids de la tomate démontrant la faisabilité de la complémentation fonctionnelle d'allèles quantitatifs (Frary *et al.*, 2000b).

V.2.3.3.2 Répression de l'expression

Il s'agit de réprimer l'expression du gène dans la plante sauvage comme le ferait la mutation (hypothèse sous-jacente). Plusieurs techniques d'inactivation ectopique ont été mises en place.

L'inactivation de gène par la technique du *Knock out* nécessite une recombinaison homologue. Deux événements de recombinaison, un à chaque extrémité du gène, sont nécessaires pour remplacer de façon précise le gène sauvage par le gène muté. A l'exception notable de la mousse *Physcomitrella patens* (Schaefer et Zryd, 1997), les génomes nucléaires

des végétaux ne se prêtent pourtant pas à une inactivation génétique ciblée par cette technique, faute de méthodes de recombinaison homologue.

La technique des RNAi (*RNA-mediated interference*) est la plus utilisée de nos jours. Elle permet de bloquer l'activité d'un gène par interférence au niveau des ARNm. Cette méthode tire profit de la découverte récente de la capacité des cellules eucaryotes à reconnaître les ARN double brin et à dégrader de façon spécifique les ARN ayant la même séquence que ces double brins. Les mécanismes moléculaires sous-jacents à ce phénomène sont extrêmement complexes et font actuellement l'objet de nombreuses recherches. Découverte à l'origine comme un mécanisme de défense contre les virus à ARN, la dégradation ciblée des transcrits dans les cellules eucaryotes est maintenant considérée comme un phénomène très général de régulation de l'expression des gènes nucléaires. Cette technique a été très utilisée pour inhiber la fonction de gènes chez *Caenorhabditis elegans* (Fire *et al.*, 1998) et a depuis été appliquée avec succès à d'autres organismes. Chez les plantes, des transgènes permettant l'expression d'ARN ayant une structure en « épingle à cheveux » sont utilisés pour éteindre de façon ciblée l'expression d'un gène. Cette technique a l'avantage d'être ciblée et nécessite seulement la construction d'un vecteur de transformation spécifique pour chaque gène. Chez *Arabidopsis thaliana*, l'activité des gènes AGAMOUS, CLAVATA3, APETALA1 et PERIANTHIA a pu ainsi être réduite (Chuang et Meyerowitz, 2000).

V.2.3.3.3 Etude de l'expression du gène

L'essor de la biologie moléculaire de ces 30 dernières années a été rendu possible par la découverte des enzymes de restriction dans les années 70, puis par celle de la PCR (Polymerase Chain Reaction) en 1983 par Kary Mullis (cité dans Mullis, 1994). De nombreuses méthodologies sont disponibles aujourd'hui pour étudier un gène muté. Parmi elles, on retrouve l'étude de l'expression spatiale ou temporelle du gène (Northern blot, dot-blot, sqRT-PCR ou Q-PCR...), c'est-à-dire de la présence d'un ARNm et/ou de la protéine dans différents types cellulaires, par exemple pendant le développement, lors de l'infection d'un pathogène ou dans différents environnements. La localisation subcellulaire et les modifications post-traductionnelles peuvent aussi apporter des éléments de réponse (analyse fine de la méthylation, isolation de la protéine...). Il est possible, en routine, d'exprimer la protéine correspondante dans un hôte bactérien sous la forme, par exemple, d'une protéine de fusion avec la glutathion-S-transférase ou avec une étiquette 6-histidine. Au fur et à mesure,

des méthodes de plus en plus sophistiquées voient le jour. Elles permettent des manipulations très fines des séquences d'acides nucléiques et ainsi l'analyse de l'expression des gènes.

V.2.3.3.4 Analyse complémentaire par rapport aux mutations épigénétiques

Certaines caractéristiques comme un taux de réversion élevé ou l'absence de polymorphisme laissent à supposer un phénomène d'épiallélisme. La vérification de cette hypothèse est facilitée par l'obtention de la séquence complète. La séquence nucléotidique donne accès au site de restriction enzymatique. De même, le taux de méthylation du gène chez le mutant peut être testé par des digestions spécifiques. La présence d'un élément transposable, de séquences similaires ou complémentaires sur les séquences adjacentes est aussi susceptible d'expliquer l'inactivation du gène.

Chez le grand muflier (*Antirrhinum majus* L), deux allèles semi-dominants différents issus de mutations, niv-525 et niv-571, sont associés à des mécanismes d'inactivation d'expression de gène (Coen et Carpenter 1988, Bollman *et al.*, 1991). Ils sont localisés au niveau du même locus, celui-ci correspondant à un gène de chalcone synthase et déterminant la couleur des fleurs. Les allèles niv-525 et niv-571 conduisent à des fleurs blanches, lesquelles sont rouges chez la plante sauvage. L'allèle niv-525 est associé à une duplication d'une partie du gène en orientation anti-sens (Coen et Carpenter, 1988), tandis que l'allèle niv-571 provient de duplications partielles du gène en trois copies dont une est en orientation anti-sens (Bollman *et al.*, 1991). Cet allèle niv-571 contient de plus un élément transposable *Tam3* (pour transposon *A. majus*) responsable de la décoloration de la fleur (Coen *et al.*, 1986). La couleur pâle résulte de l'insertion de *Tam3* dans l'enzyme codant la fabrication du pigment rouge. La réversion, très fréquente, restaure le phénotype rouge dans ces cellules. Lorsqu'une insertion se produit dans une cellule sexuelle, la caractéristique phénotypique - fleurs complètement blanches - est transmise aux générations suivantes. Lorsque l'élément transposable s'excise hors du gène de coloration en provoquant des ré-arrangements divers dans la séquence, l'expression de ce gène est alors modifiée en conséquence. Cela va d'une quasi-extinction en passant par une faible expression jusqu'à une expression normale (Coen *et al.*, 1986). Cette variation d'expression conduit à une très grande diversité de phénotypes héréditaires depuis des fleurs totalement blanches, roses pâles, roses foncées jusqu'au rouge intense (Figure I.17).

Très récemment, la mutation *Cnr* (*Colorless non-ripening*) touchant la tomate (*Lycopersicon esculentum*) a été identifiée comme étant une épimutation dominante et

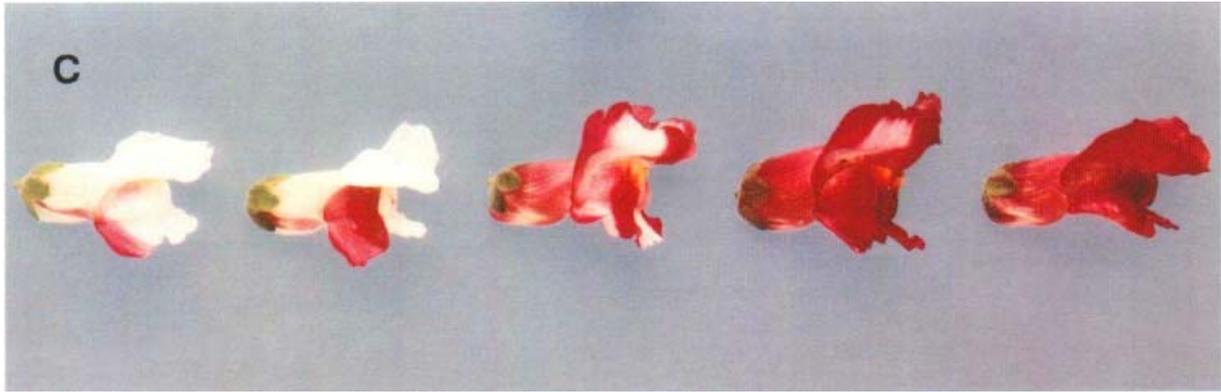


Figure I.17 : Fleurs d'*Antirrhinum majus* L. de différents géotypes $Niv^*/niv-571$ montrant des événements de réversion somatiques indépendants. (D'après Bollman *et al.*, 1991)

pléiotropique (Manning *et al.*, 2006). Elle affecte en effet plusieurs caractères de maturation du fruit (réduction de la production d'éthylène, inhibition du ramollissement du fruit, peau jaune et péricarpe sans couleur, réduction de l'adhésion cellulaire entre cellules du péricarpe, etc.). Elle a auparavant été identifiée et cartographiée sur le chromosome 2 (Thompson *et al.*, 1999 ; Tör *et al.*, 2002). La présence d'une SBP-box (*SQUAMOSA Promoter Binding protein-like*) au niveau du locus *Cnr* a été démontrée par clonage positionnel et inhibition ectopique. Le phénotype *Cnr* résulte en fait d'une épimutation spontanée du promoteur de ce gène (Manning *et al.*, 2006).

V.3 Caractérisation des effets de la mutation

Dans certains cas, il n'est pas possible de cartographier et d'isoler le gène ou le QTL atteint par la mutation (pas de cartes génétiques ou physiques disponibles, pas de polymorphisme, etc.). Une vision globale des effets de la mutation sur les produits des gènes (ARN, protéines ou métabolites) ou sur le phénotype permettent de mieux appréhender les processus mis en jeu. Définir l'ensemble des caractères modifiés chez le mutant par rapport au type sauvage est une façon de caractériser la mutation et d'aboutir, par comparaison avec des mutations connues ou des gènes identifiés, à mieux comprendre les processus impliqués et parfois même à aboutir au gène muté.

Différents niveaux d'étude peuvent être abordés : celui de l'ADN (voir partie précédente), au niveau du transcriptome, du protéome, du métabolome, ou alors du phénotype visuel (cellulaire ou phénotypique).

V.3.1 Analyse au niveau du phénotype visuel

Depuis la néolithique, l'homme a isolé ou sélectionné les mutations à partir d'un phénotype visuel. Il a ainsi réussi, de façon empirique et bien avant de connaître les lois de l'hérédité, à domestiquer et améliorer les végétaux et les animaux en sélectionnant les individus les mieux adaptés à ses besoins. L'augmentation soutenue de la productivité agricole ou l'amélioration des produits végétaux observée au cours de ces deux derniers siècles est imputable en partie à l'hybridation sexuée intra- / ou inter-spécifique, et à l'exploitation de mutants. Ce repérage visuel a ainsi conduit à retenir le mutant d'Arabica Bourbon pointu d'après sa résistance à la sécheresse et son port particulier. De la même manière ont été propagées toutes les chimères périclines existantes en horticulture.

Avant de se lancer dans des analyses fines disponibles de nos jours en biologie (au niveau cellulaire, protéique ou nucléique par exemple), il est important d'observer et de

comprendre comment la plante est modifiée, extérieurement, par la mutation. Dans le cas d'une mutation monogénique, le phénotype obtenu est généralement décrit comme étant le résultat direct de la modification de l'expression d'un seul gène, gène pouvant avoir des effets pléiotropiques. Cette vision est partielle, la physiologie et le développement du mutant étant modifié et adapté en partie en réponse à la mutation. Ainsi le phénotype d'un individu muté à un locus peut résulter de la modification de l'expression de plusieurs gènes. L'établissement d'une relation directe entre un phénotype et une fonction doit toujours être faite de manière prudente. De plus, l'analyse du phénotype se fait en comparant la plante mutée au type sauvage sous différentes conditions, l'expression du phénotype étant souvent conditionnelle. Par exemple, une mutation dans un gène de résistance aux pathogènes ne donnera pas un phénotype différent du sauvage en l'absence d'infection. Trois domaines d'étude seront ici pris en exemple pour illustrer l'intérêt du phénotypage des mutants naturels.

V.3.1.1 Description des effets de la mutation par l'écophysiologie

La description des effets d'une mutation par l'écophysiologie est possible si elle intervient sur la réponse normale de la plante à des stimuli extérieurs différents. La plasticité phénotypique étant contrôlée par des « normes de réaction » de la plante aux facteurs environnementaux (Wright et McConnaughay, 2002, Luquet *et al.*, 2005), ces dernières déterminent en grande partie l'adaptabilité de la plante aux variations de milieux. Leur étude requiert des modèles particuliers, capables de simuler de façon dynamique le phénotype et sa plasticité dans des environnements variables (sécheresse, rayonnement...). De tels modèles formalisent ainsi de façon pertinente les règles organogénétiques et morphogénétiques, clés de la plasticité phénotypique. Si les fonctions (équations) mathématiques choisies sont représentatives de ces normes, leurs paramètres pourront alors être reliés à la diversité induite par la mutation. Il ne s'agit pas simplement de lister les caractères morphologiques ou les variables phénotypiques présentant de la variabilité, mais de faire une analyse fonctionnelle. Les phénotypes sont caractérisés au travers de courbes de réponses à l'échelle de la plante qui doivent être stables pour une large gamme de conditions environnementales. A cette condition, ces courbes de réponse prennent le statut de caractéristiques phénotypiques d'un génotype. Il est alors possible de rechercher le lien physique entre la caractéristique phénotypique et le génome par le calcul de son héritabilité ou la recherche de QTLs et de gènes candidats. Chez le maïs, une modélisation écophysiologique des réponses de la croissance au déficit hydrique a permis de traduire de manière robuste des phénotypes de réponse au déficit hydrique en variables quantitatives héréditaires (Reymond *et al.*, 2003). Elle

a impliqué une dissection fine des variables sous-jacentes à la croissance foliaire à différents niveaux d'organisation (cellule, feuille, plante) et une prise en compte explicite de l'environnement au travers de plusieurs variables pertinentes. Le modèle Ecomeristem a été développé (Dingkuhn *et al.*, 2005, Luquet *et al.* 2006) à partir de choix conceptuels formalisant les normes de réaction de la plante. Ces choix ont été validés par plusieurs expérimentations en milieu contrôlé, notamment sur les effets morphogénétiques de la carence en phosphore et des stress lumineux et hydriques (Dingkuhn *et al.*, 2006). Dans le cadre d'un programme visant à évaluer la diversité naturelle de traits d'intérêt agronomiques dans une *core-collection* d'*Arabidopsis thaliana* (programme Gabi-Génoplatte sur la collection d'accessions présentée dans McKhann *et al.*, 2004), des concepts et des outils méthodologiques ont été développés pour analyser de façon reproductible la variabilité phénotypique de la réponse de la croissance foliaire au déficit hydrique du sol chez cette espèce (Granier *et al.*, 2006).

V.3.1.2 Caractérisation phénologique des effets de la mutation

La phénologie, étude des variations saisonnières, de la croissance et du développement des plantes (Schnelle, 1955), est un autre exemple de domaine de la biologie permettant de décrire l'effet de mutations.

Agua Nueva II, un mutant de la variété Golden delicious de pomme (*Malus domestica*) a été ainsi caractérisé d'après sa mise à fleur précoce nécessitant moins de 500 heures de froid (Ramirez et Malta Beltran, 1986). Ce mutant permet de mieux comprendre le rôle des auxines, cytokinines et gibbérellines dans l'induction florale (Ramirez, 2001 ; Ramirez *et al.*, 2004).

Un exemple de caractérisation phénologique d'une mutation ayant abouti à l'isolement de gènes mutés et à la compréhension des processus biologiques impliqués illustrera ce paragraphe. Chez *Arabidopsis*, des mutants fleurissant tardivement en condition de jours longs ont été repérés. La mutation peut affecter soit la détection, soit la réaction à la durée du jour et ainsi l'induction florale. Ces mutants ont fourni l'accès à certains des gènes contrôlant ces processus. Le gène *CONSTANS* (*CO*) a été particulièrement utile pour mieux comprendre la réaction des plantes à la durée du jour (Putterill *et al.*, 1995). Récemment, il a été démontré comme étant exprimé dans le phloème et dans d'autres tissus. Son activation spécifique dans le phloème est suffisante pour assurer la promotion de la floraison au sommet (An *et al.*, 2004). Dans les cellules du phloème, *CO* active l'expression d'autres gènes, dont le plus sensible à l'activité de *CO* est un gène appelé *FLOWERING LOCUS T* (*FT*) (Suarez-Lopez *et*

al., 2001). L'application de la génétique moléculaire à l'étude de la floraison chez *Arabidopsis* a permis l'identification des gènes contrôlant les réactions à la durée du jour. Ces gènes fournissent des clés pour comprendre certains domaines de la physiologie des plantes. Ils pourraient permettre par exemple de trouver le moyen par lequel les plantes détectent la durée du jour ou alors la nature du « florigen », le signal de longue distance transmis des feuilles jusqu'au sommet induisant l'induction florale. Des études utilisant des mutants déficients en phytochrome sont menés afin de faire le lien entre les phytochromes et ces gènes identifiés (Blazquez et Weigel, 1999 ; Izawa *et al.*, 2002).

V.3.1.3 Analyses des effets de la mutation au niveau cellulaire

La caractérisation phénotypique des effets de la mutation peut aussi se faire au niveau cellulaire, en particulier quand ils touchent un caractère morphologique.

Des observations morphologiques et histologiques ont été faites sur des mutants nains de divers taxons de ligneux (Brown *et al.*, 1994). Les mutations étaient apparues dans des descendance (origine sexuelle) ou sur des branches (origine somatique). Au niveau du phénotype visuel, les effets du nanisme étaient semblables pour tous les individus, provoquant la réduction globale de la taille des entre-nœuds. Des différences significatives dans les origines cellulaires du nanisme sont néanmoins apparues. Si chez les mutants apparus dans une descendance, le nanisme était dû principalement à une réduction du nombre de cellules, chez ceux d'origine somatique il était provoqué principalement par une réduction de la longueur des cellules. La poursuite de cette étude au niveau hormonal a été faite grâce à ces résultats et a pu orienter les recherches vers l'origine de chacun des types de mutation. Ainsi, les gibbérellines (GAs) induisant l'activité subapicale méristématique chez des plantes dicotylédones (Sachs *et al.*, 1959a et b), des travaux portant sur ces hormones ont par la suite été menés sur un de ces mutants nains d'origine sexuelle, provenant du *Styrax* d'Amérique (*Liquidambar styraciflua* L.) (Sommer *et al.*, 1999a). Le mutant s'est révélé être sensible à l'application de GAs exogènes. Des évaluations histologiques des profils cellulaires sur les mutants traités ou non ont montré une augmentation de croissance de 89%, due à un nombre de cellules bien plus important. Les phénomènes moléculaires en cause (déficience dans un des maillons de la chaîne de biosynthèse des GAs, mauvaise transmission du signal ou encore anabolisme anarchique) sont encore recherchés.

La modification d'un caractère ne permet donc pas de conclure immédiatement sur une fonction biologique, mais peut avoir de nombreuses causes moléculaires. Comme il a été décrit, un mutant nain peut être affecté dans l'élongation cellulaire ou la division cellulaire,

mais ces phénomènes peuvent être dus à une mauvaise mise en place de la paroi, à une perception modifiée de la lumière, à une modification de la balance hormonale, etc. Dans un deuxième temps, des études plus précises sont nécessaires pour mieux cibler la fonction biologique atteinte.

V.3.2 Analyse au niveau du métabolome

Le métabolome se définit comme l'ensemble des petites molécules synthétisées dans l'organisme et requises pour la vie d'une cellule en général (maintenance des fonctions, croissance et fonctionnalité) (Beecher, 2003). Les molécules suivantes sont considérées des sources ou des puits pour le métabolome mais n'en font pas partie : les enzymes, autres molécules et la plupart des peptides ; le matériel génétique (toutes les formes d'ADN ou d'ARN) ; les molécules structurales (glycosaminoglycannes) et autres unités polymères (glycogène). Les métabolites xénobiotiques, par définition, ne sont pas natives de l'individu et ne font pas non plus partie du métabolome. Les composés essentiels ou nutritionnels requis par l'individu ne sont pas réellement synthétisés, mais sont nécessaires à la vie de la cellule. Ils font partie du métabolome comme intrants de la nutrition.

Bien des caractères macroscopiques sont directement reliés à des flux ou à des pools métaboliques non abordables par une analyse macroscopique, à partir du protéome ou du transcriptome. De plus, le taux de métabolites présents dans des voies apparemment indépendantes peut être altéré par une mutation sur un gène à effets pléiotropiques. Pour comprendre de tels effets, une étude détaillée de l'identité et de la quantité des métabolites peut apporter de nombreuses informations.

On dispose aujourd'hui d'outils techniques performants pour mesurer ou calculer ces quantités *in vitro* : l'analyse du métabolome par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS) ou Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) permet de déterminer les teneurs en métabolites. Des valeurs de flux peuvent aussi être déduites des mesures par RMN. Ces techniques sont associées à des outils de statistique permettant aujourd'hui d'affiner les analyses et d'accélérer les processus de découverte et d'identification de nombreuses molécules (Ezan, 2002).

La caractérisation des effets des mutations d'intérêt agronomique au niveau du métabolome est fondamentale pour l'amélioration des produits issus des végétaux. Les composantes classiques de la qualité (sucres, acides, etc.) sont évidemment prises en compte dans l'étude de ces mutants, mais depuis plusieurs années l'attention s'est également focalisée

sur les métabolites secondaires ayant aussi un rôle sur la qualité. Ces derniers, par leurs propriétés physico-chimiques, jouent un rôle déterminant dans l'attractivité visuelle (pigments), la flaveur (composés volatils) et la valeur santé (comme les tanins, etc.). De même, figurent dans les caractères d'intérêt ceux qui sont liés à la texture et au comportement après récolte (biosynthèse d'éthylène, modifications pariétales, vitesse d'évolution, réponse physiologique aux modifications d'atmosphères de conservation). Tous ces critères ont permis d'élargir la recherche sur des mutants naturels intéressants, délaissés jusqu'alors. La tomate est aujourd'hui une espèce modèle pour l'ensemble des fruits charnus. Les bases génétiques de sa qualité organoleptique sont étudiées dans leur globalité, sous des aspects fondamentaux de déterminisme génétique, mais aussi sous des aspects plus appliqués. Les caractéristiques sensorielles des saveurs sucrées et acides de ce fruit sont apparues bien corrélées aux mesures chimiques des teneurs en sucres et en acides. Facilement quantifiables, ces derniers peuvent servir de moyens partiels d'évaluation de la flaveur (réunion des perceptions provoquées par le goût et l'odeur) et de l'isolement de mutant d'intérêt (Causse *et al.*, 2001).

Les études d'analyse du métabolome peuvent être la première étape dans la découverte du gène muté. Ainsi, les dosages biochimiques chez un mutant de pin à encens (*Pinus taeda* L.) ont montré des modifications de composition de lignine importantes (Mac Kay *et al.*, 1997). L'incorporation massive de la coniféraldehyde, substrat de la cinnamyl alcohol dehydrogenase (*cad*), a été rapprochée du taux d'expression de l'enzyme, sévèrement réduit chez le mutant. Enfin, le phénotype du mutant, une coloration marron foncé du bois, ressemblait à celui de plantes transgéniques chez lesquelles cette coloration est provoquée par une diminution de cette même enzyme. Toutes ses observations ont conduit à identifier la mutation comme affectant le gène *cad*. Elle résulte de l'insertion de deux paires de base d'adénosine dans l'exon 5 provoquant ainsi l'arrêt de traduction de la protéine (Gill *et al.*, 2003).

Deux exemples seront pris dans l'étude de la biosynthèse des caroténoïdes (pigment), dont la chaîne de biosynthèse des métabolites est bien décrite :

- Dans le premier exemple, la caractérisation du métabolome a permis d'émettre des hypothèses quant aux facteurs moléculaires atteints. L'oranger (*Citrus sinensis* L.) est parmi les espèces de *Citrus* celle où il a été isolé le plus grand nombre de mutations spontanées somatiques (Saunt, 2000). Pinalate, un mutant naturel de la variété «Navel», a ainsi été caractérisé au niveau de son métabolome (Rodrigo *et al.*, 2003). Mis à part la coloration jaune de ses fruits (Figure I.18), dans des conditions classiques de culture, l'arbre du Pinalate ne se



Figure I.18 : Fruits mature de *Citrus sinensis* cv. Navelate (fruits orange) et de *Citrus sinensis* mutant Pinalate (fruits jaunes)

différencie aucunement de la souche sauvage. Les intermédiaires de la chaîne de biosynthèse des caroténoïdes ont été dosés chez le Pinalate et la Navel (Figure I.19) Une accumulation anormale et majoritaire de caroténoïdes linéaires précurseurs des caroténoïdes (phytoène, phytofluène et ζ -carotène) a été détectée dans le flavedo (couche externe de l'écorce d'orange) du mutant. Dans ce même tissu, le taux d'acide abscissique, synthétisé à partir des β -caroténoïdes, y est trois à six fois plus faible. La mutation *pinalate* serait une altération fruit-spécifique provenant d'une déficience en ζ -carotène désaturase ou d'un processus associé à la désaturation du ζ -carotène.

- Dans le second exemple, pris sur la série allélique de mutants d'*Arabidopsis* nommés *aba* (plus tard appelés *aba1*) (Koornneef *et al.*, 1982), l'analyse biochimique a permis de cibler le gène atteint par la mutation ou du moins l'étape de la chaîne métabolique touchée. Ces mutants présentent les caractères typiques de la déficience en acide abscissique (ABA) : réduction importante de la dormance des graines, plus grande perte d'eau par évapotranspiration des plantes, et teneur en ABA réduite, tant dans les parties aériennes que dans les graines en développement (Koornneef *et al.*, 1982). Tous les phénotypes observés sont réversibles par des applications exogènes d'ABA (Rock et Zeevaart, 1991). La comparaison qualitative et quantitative par HPLC des caroténoïdes présents dans les feuilles a mis en évidence chez le mutant une réduction de certains composés clés comme les époxycaroténoïdes majeurs (*trans*-violaxanthine et 9'-*cis*-néoxanthine) et une accumulation de leurs précurseurs comme de la zéaxanthine (Rock et Zeevaart, 1991). Par ces observations et une étude complémentaire comprenant des dosages plus ciblés (Duckham *et al.*, 1991), l'étape-clé touchée par la mutation a pu être identifiée comme étant époxydation de la zéaxanthine en violaxanthine *via* la formation d'anthéroxanthine (Figure I.19).

V.3.3 Analyse au niveau du protéome

Le mot protéome désigne l'ensemble des protéines exprimées (PROTEIN COMPLEMENT EXPRESSED BY A GENOME, Wasinger *et al.*, 1995). Son analyse, la protéomique, réunit un ensemble de techniques d'étude des protéines à grande échelle. Elle est largement utilisée en tant que moyen d'analyser l'expression des protéines sous différentes situations, depuis les contraintes abiotiques jusqu'à la différenciation et la réponse à des hormones en passant par la caractérisation de mutants.

La protéomique est aussi un outil puissant et utile pour différencier des génotypes, même avec un fond génétique proche. Les événements de régulation post-transcriptionnels

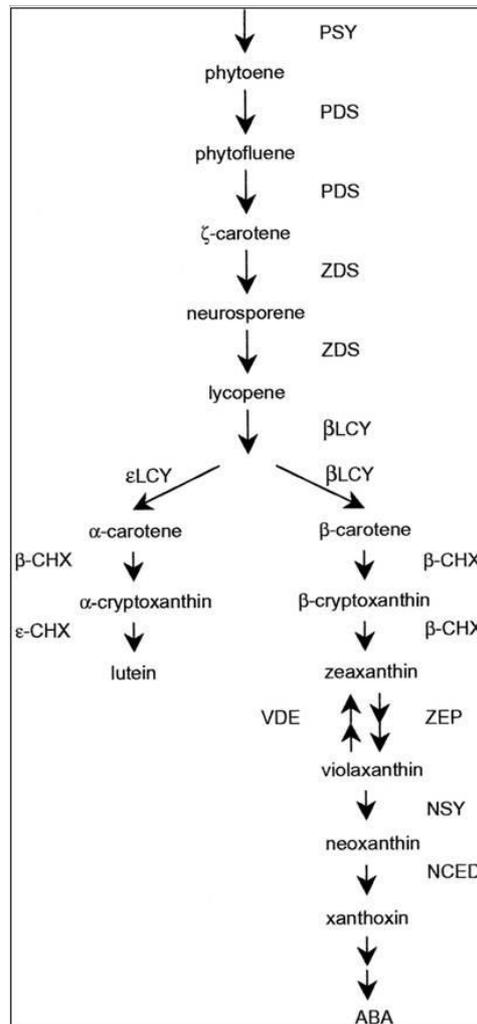


Figure I.19 : Diagramme de la chaîne de biosynthèse des caroténoïdes chez les plantes. PSY, phytoène synthase; PDS, phytoène desaturase; ZDS, ζ-carotène desaturase; β-LCY, β-lycopène cyclase; ε-LCY, ε-lycopène cyclase; β-CHX, β-carotène hydroxylase; ε-CHX, ε-carotène hydroxylase; ZEP, zeaxanthine époxidase; VDE, violaxanthine dé-époxydase; NSY, neoxanthine synthase; NCED, 9-*cis*-époxy-caroténoïde dioxygénase. (Rodrigo *et al.*, 2003).

sont rarement détectés à travers l'analyse des profils d'expression des gènes. La corrélation entre les quantités de protéine et d'ARN messagers (ARNm) peut être très faible (exemples : Gygi *et al.*, 1999 ; Griffin *et al.*, 2002), ce qui rend dangereuse la prédiction des quantités de protéine à partir des quantités d'ARNm. De simples mutations ponctuelles récessives conduisent parfois en effet à des différences majeures de la composition en protéines (De Vienne *et al.*, 1988 ; De Vienne *et al.*, 1996 ; Damerval et Le Guilloux, 1998 ; Santoni *et al.*, 1997). La localisation sub-cellulaire, les modifications post-traductionnelles et les interactions avec d'autres molécules sont des informations venant compléter l'annotation des gènes et contribuant à l'identification de leur fonction. Les analyses du protéome sont intégratives à deux niveaux : 1/ intégration « intra-protéome » quand elles cherchent à mettre en évidence des ensembles de protéines co-régulées ou à identifier les protéines répondant à un traitement particulier ; et 2/ intégration « au sens large » quand l'objectif est de mettre en évidence des relations entre l'expression des protéines et des variations physiologiques ou phénotypiques.

La technologie la plus répandue pour étudier les protéines est l'analyse par électrophorèse sur gels bidimensionnels (EBD) (O'Farrell, 1975). Elle sépare les protéines suivant leur point isoélectrique et leur poids moléculaire. L'EBD permet de visualiser environ un millier de protéines, les plus abondantes d'un tissu ou organe. Le couplage à une analyse par spectrométrie de masse permet ensuite d'identifier les protéines détectées. L'EBD est couramment utilisée chez les espèces végétales depuis le milieu des années 90 (Kamo *et al.*, 1995). Elle reste encore très marginale pour certaines espèces comme les fruitiers, où seuls les travaux récents sur le raisin (Sarry *et al.*, 2004) ont été publiés. En fait, peu d'espèces pérennes et/ou fruitières ont bénéficié d'un séquençage massif et peu de protéines complètes sont connues, ce qui rend difficile l'identification des spots.

Dans certains cas, la seule comparaison des profils d'électrophorèse bidimensionnelle provenant de mutants suffit à tirer des informations d'intérêt biologique. Des mutations du développement ont été comparés aux types sauvages par EBD chez *Arabidopsis* (Santoni *et al.*, 1997). Ces mutations ponctuelles récessives conduisent à des différences de 1,8 à 7,9% des protéines par rapport au type sauvage. Un phénogramme a été construit à partir de distances prenant en compte les variations quantitatives des protéines affectées. La classification ainsi obtenue était en accord avec les ressemblances entre les phénotypes de ces différents mutants, et avec les relations d'allélisme déjà connues entre eux. Par ailleurs, ces mutants de développement ont été comparés aux type sauvage en présence d'hormones : un mutant déjà connu comme surproducteur d'auxine se regroupait bien avec le type sauvage

cultivé en présence d'un analogue de cette hormone. Mieux encore, des prédictions ont pu être faites à partir de ces comparaisons : un mutant *crystal* a été regroupé par les analyses EBD avec le sauvage cultivé en présence de cytokinine, alors que son phénotype n'en était pas proche. Après vérification, il s'agissait bien d'un mutant surproducteur de cytokinine (Faure *et al.*, 1998). Dans cette analyse, les relations entre mutants, leur classification et la prédiction des métabolites affectés sont basés sur la ressemblance entre les EBD et l'utilisation d'un grand nombre de marqueurs, et non sur l'identification des protéines.

L'identification des protéines impliquées peut aussi être l'objectif principal des analyses de protéome. La puissance de la protéomique dans la caractérisation des mutants est d'ailleurs encore plus évidente dans les études des mutations pléiotropiques. Gottlieb et de Vienne (1988) ont comparé deux lignées quasi-isogéniques de pois se différenciant par le gène *r* déterminant des grains rond (RR) ou ridés (rr). Dans le protéome des graines matures, environ 10% des taches se différencient en quantité, confirmant les nombreuses différences physiologiques connues entre les deux types de graines. De même, l'analyse des effets pléiotropiques de la mutation opaque2 (*o2*) (Damerval et Le Guilloux, 1998) a été réalisée par protéomique. Cette mutation rend opaque le grain de maïs normalement translucide. Le gène *o2* est un facteur de transcription exprimé dans l'albumen. Trente-six protéines affectées par la mutation ont été mises en évidence dans des fonds génétiques différents. Parmi elles, il a été identifié non seulement des protéines déjà connues pour contenir des sites de reconnaissance de *o2* dans leur promoteur, mais aussi des protéines impliquées dans le métabolisme des acides aminés et du carbone. Cibles directes ou indirectes du facteur de transcription, elles pourraient être responsables des effets connus de cette mutation sur ces métabolismes. Enfin chez la tomate (Herbik *et al.*, 1996), la comparaison des profils 2D entre le sauvage et un mutant *chloronerva* déficient en fer a conduit à l'identification de plusieurs enzymes montrant des variations dans leur concentration. Chez le mutant, des enzymes, impliquées dans le métabolisme anaérobie, sont induites dans les racines et d'autres, impliquées dans le stress lié à la défense contre les pathogènes, sont réprimées dans les feuilles.

V.3.4 Analyse au niveau du transcriptome

Les méthodes d'analyse de l'expression du génome (transcriptome) ont pu voir le jour et prendre de l'ampleur grâce aux avancées simultanées faites en biologie moléculaire (PCR, développement des vecteurs de clonage, etc.), au niveau technologique du matériel (séquenceur, réseaux d'ADN, etc.), 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).

Ces méthodes permettent, soit de trouver des séquences liées à une condition physiologique particulière (gènes différentiellement exprimés), soit d'analyser de façon exhaustive l'ensemble du génome dans des conditions définies par l'utilisateur. Les paragraphes suivants proposent une description des principales techniques permettant d'analyser les effets d'une mutation au niveau du transcriptome.

V.3.4.1 Analyses moléculaires basées sur l'amplification PCR et le séquençage

Un grand choix d'analyses a été développé pour quantifier l'expression des gènes dans les tissus végétaux. Si les méthodes classiques et éprouvées du Northern blot et de la PCR quantitative sont sensibles et permettent une quantification précise de transcrits spécifiques, elles ne sont pas adaptées pour des criblages systématiques.

V.3.4.1.1 Le « RNA fingerprinting » et l'AFLP-cDNA

Utilisant les ADN complémentaires (ADNc) synthétisés à partir d'ARNm, le « RNA fingerprinting » et l'AFLP-cDNA (Amplified Fragment Length Polymorphism à partir d'ADNc) permettent de visualiser de manière indirecte des sous-populations d'ARNm, de les comparer entre elles et d'y identifier des séquences codantes exprimées de manière différentielle. Peu coûteuses, elles peuvent révéler un grand nombre de marqueurs en un temps relativement court. Elles sont aussi utiles pour comparer plusieurs populations d'ARN en même temps et d'isoler des gènes induits ou réprimés.

Les techniques connues sous le nom de « RNA fingerprinting » incluent le « differential display » (Liang et Pardee, 1992) et les techniques « RNA fingerprinting » avec des amorces arbitraires de PCR (RAPD-PCR) (Random Amplification of Polymorphic DNA) (Welsh *et al.*, 1992). Les deux méthodes ont été introduites vers 1992 et sont basées sur l'amplification PCR de fragments aléatoires de gènes à partir de deux ou plus échantillons d'ARN. Depuis l'introduction de cette technique, le « differential display » a été beaucoup plus utilisé que la RAPD-PCR. Le « differential display » utilise une amorce polyT avec une ou deux bases supplémentaires, alors que la RAPD-PCR utilise une amorce aléatoire. Après la rétro-transcription, les populations d'ADNc sont amplifiées avec l'amorce de la RT et une seconde amorce arbitraire.

La technique des cDNA-AFLP s'est développée sur le principe de celle des AFLP (Bachem *et al.*, 1996 ; Durrant *et al.*, 2000). Son principe repose sur l'amplification sélective de fragments de restriction générés à partir d'un échantillon d'ADN génomique. Elle révèle à la fois un polymorphisme de site de restriction et d'hybridation des bases arbitraires. Le « Gene Calling » (Shimkets, 1999), « genEST » (Qin *et al.*, 2001) et « TOGA » (Sutcliffe *et al.*, 2000) en sont dérivés et permettent aussi d'identifier et d'établir les profils d'expression de fragments d'ADNc mutés.

V.3.4.1.2 Analyse par séquençage exhaustif (« Serial Analysis Gene Expression » ou SAGE)

L'analyse en série de l'expression des gènes (SAGE) combine le « differential display » et le séquençage d'ADNc (Velculescu *et al.*, 1995). Elle conserve l'avantage de n'avoir aucun *a priori* sur la nature des gènes analysés, et permet en plus de mesurer leur niveau d'expression relatif, sur des populations de plusieurs milliers de gènes. La méthode est basée sur l'obtention et le séquençage de fragments d'ADNc (étiquettes de 10 pb), qui sont regroupés en banques de clones. Une étiquette donnée est théoriquement spécifique du messenger dont elle est issue, et le nombre de ses copies dans la banque est directement proportionnel à l'abondance relative de ce messenger dans le tissu initialement analysé. Dans la pratique, cette identification se fait à partir des séquences génomiques annotées, des séquences d'ADNc et des EST. La méthode SAGE, bien que puissante, est coûteuse et reste inexploitable dans bien des espèces étant donné la pauvreté de l'annotation des séquences. Chez les végétaux, elle a été utilisée récemment sur *Arabidopsis thaliana* (Fizames *et al.*, 2004 ; Chakravarthy *et al.*, 2003). Dans le cas de l'étude de Chakravarthy et collaborateurs (2003), cette méthode a permis de comparer chez *Arabidopsis* les transcriptomes d'un mutant sur-exprimant le gène exogène Pti4 de tomate et de la variété non transformée. Le gène *Pti4* est impliqué dans la réponse à un stress lié aux pathogènes (famille des gènes PR « Pathogenesis-Related gene »). Cette comparaison des transcrits a révélé 78 gènes différemment exprimés, codant par exemple des protéines de défense contre les pathogènes, des kinases, des transporteurs ou encore deux facteurs de transcription. Plusieurs de ces gènes s'expriment chez le sauvage lors d'une infection par *Pseudomonas syringae* pv *tomato*.

V.3.4.1.3 L'Hybridation Soustractive Suppressive (SSH)

L'Hybridation Soustractive Suppressive (Diatchenko *et al.*, 1996) combine des étapes classiques de biologie moléculaire dans le but d'identifier des gènes dont l'expression est

modulée lors d'un traitement. Elle permet théoriquement un enrichissement de 1000 fois, en séquences faiblement exprimées (Diatchenko *et al.*, 1996). Grâce à une étape d'amplification PCR, la population d'ADNc est normalisée afin de pouvoir avoir accès aux gènes faiblement exprimés. Une étape d'hybridation entre les ADNc issus de deux traitements (ADNc Tester et Driver) enrichie ensuite la banque correspondante en messagers dont l'abondance est modifiée par le traitement. Cette méthode a été utilisée avec succès en génomique humaine (Chan *et al.*, 2003 ; Nishikawa *et al.*, 2003). Chez les plantes, de nombreux travaux ont été réalisés sur différents modèles comme la canne à sucre (Watt, 2003), le riz (Chen *et al.*, 2002) ou encore *Arabidopsis* (Hinderhofer et Zentgraf, 2001). Cette technique a aussi servi pour les études d'interaction hôte/pathogène chez le cacao (Verica *et al.*, 2004). Elle a plusieurs avantages : d'une part, elle est sans *a priori* et permet ainsi d'avoir accès à des gènes inconnus ou non annotés, et d'autre part, elle nécessite peu de ressources en ARN, permettant une relative facilité de mise en place quel que soit le tissu considéré. La technique MOS (Mirror orientation Selection) (Rebrikov *et al.*, 2000) permet de diminuer le nombre de « faux positifs » (gènes non différentiellement exprimés se retrouvant dans les banques SSH) quand ces derniers sont dus à une sur-expression des gènes. Dans ce cas, la soustraction est en effet bien moins efficace. Cette technique a lieu juste après la construction des banques SSH.

V.3.4.2 Les techniques comparant les transcriptomes par hybridation

Les autres approches utilisées pour quantifier l'expression des gènes sont basées sur l'hybridation d'une population entière d'ADNc à des fragments d'ADN fixés sur un support. Elles diffèrent par la densité des sondes fixées : macro-réseaux (« *macroarrays* » comportant quelques dizaines de cibles par cm²) et des micro-réseaux (« *micro -arrays* » avec des milliers de sondes par cm²). Le support utilisé est respectivement constitué d'une membrane de nylon (filtres à ADN) ou d'une lame de verre (puces à ADN).

La terminologie « sonde » et « cible » dans les expériences d'hybridation moléculaire est précise. Les cibles correspondent aux molécules d'acides nucléiques (ARNm dans le cas des macro-arrays) que l'on veut détecter : elles se trouvent en mélange complexe. Les sondes sont les molécules d'acides nucléiques servant à piéger par hybridation les molécules ciblées : ce sont des molécules purifiées. Pour les réseaux à ADN, les sondes sont fixées au support et ne sont pas marquées, alors que les cibles sont en solution et sont marquées.

Pour les puces à ADN, deux méthodes de fixation des ADN sur les lames différencient les puces à ADN par transfert (les ADN en solution sont déposés sur le support) des puces à ADN par synthèse « *oligochips* » (les ADN sont synthétisés directement sur la lame).

- Les sondes des *oligochips* sont constituées de petits oligonucléotides, tandis que pour les autres réseaux, elles peuvent être des EST, ADNc ou GST (*Gene Specific Tag*). Les *oligochips* sont obtenus après la synthèse à haute densité de petits oligonucléotides sur des lames de verre par photolithographie (Pease *et al.* 1994). La technologie est développée par la société Affymetrix (Fodor *et al.*, 1993) et les lames commercialisées sont utilisées pour hybrider des ADNc marqués par fluorescence (Southern, 1996). L'hybridation simultanée de deux populations d'ADNc marquées avec deux fluorochromes différents conduit à comparer le niveau d'expression de milliers de gènes entre les deux conditions.

- Pour les réseaux obtenus par dépôt d'ADN, des ESTs, obtenues à la suite des programmes de séquençage, servent souvent en tant que sondes sur ces supports. La première utilisation de cette technologie chez *A. thaliana* a été décrite par Schena *et al.* (1995). La densité des dépôts va déterminer la quantité d'ADNc nécessaire à l'hybridation. Sur les lames de verre des puces à ADN, la densité importante des sondes permet de n'utiliser qu'une petite quantité d'ADNc pour réaliser l'hybridation.

Les comparaisons de transcriptomes utilisant des filtres à ADN nécessite une plus grande quantité de matériel biologique de départ et les sondes y sont déposées avec une densité relativement faible. Le marquage des ADNc est radioactif, les hybridations pouvant être considérées comme des *Northern inverses*.

Par ailleurs, des membranes du type HDCA (*High Density Colony Array*) ont été développées et utilisées (Chen *et al.*, 2002). Cette technique est basée sur le dépôt direct de colonies bactériennes contenant comme insert les fragments issus des banques à cribler. En plus de son moindre coût engendré par l'absence de purification des ADNc déposés, elle est d'une grande simplicité de mise en oeuvre. Les colonies bactériennes sont directement déposées sur les membranes. Une fois les membranes incubées à 37°C, les bactéries sont lysées et les acides nucléiques sont fixés à la membrane. Le marquage utilisé est de type radioactif. Son défaut réside dans le manque d'uniformité de la quantité d'insert déposé sur les membranes engendrant des problèmes d'*analyse relative* d'expression. Sa simplicité de mise en place et son faible coût en font une technique bien adaptée pour réaliser un criblage sans *a priori*.

Pour toutes ces méthodes, des logiciels d'analyse d'image spécifiques sont nécessaires pour l'obtention des données issues des hybridations sur les filtres à ADN. Ceci aboutit à l'obtention d'un grand nombre de données, sous forme numérique ou sous forme de séquences. L'analyse de cette masse d'informations nécessite le développement de tests

statistiques et d'outils informatiques spécifiques. Tous les tests statistiques pour l'identification des gènes à expression différentielle sont basés sur la comparaison multiple de moyennes. Les résultats obtenus peuvent être comparés d'une expérience à l'autre ou d'un laboratoire à l'autre, via la constitution et l'exploitation de bases de données de profils d'expression, facilitant ainsi la recherche de nouvelles fonctions des gènes.

Bien que l'utilisation des puces à ADN soit relativement récente dans le domaine végétal (Schena *et al.*, 1995), plus d'une centaine de travaux englobant un choix très large d'applications ont été publiés à ce jour. Depuis le début des années 2000, malgré un coût non négligeable, les analyses sur puces ont connu une véritable explosion. A la suite des premiers travaux menés chez *Arabidopsis thaliana* pour analyser différents organes (Ruan *et al.*, 1998 ; Schena *et al.*, 1995), les puces à ADN ont très rapidement trouvé des applications plus immédiates chez d'autres espèces d'intérêt agronomique comme la fraise (Aharoni *et al.*, 2000). De plus, d'ambitieux programmes génomiques principalement orientés sur les espèces modèles comme l'arabidopsis et le maïs (AFGC, Wisman et Ohlrogge, 2000 ; ZmDB, Gai *et al.*, 2000) se sont traduits par la mise en place de plateformes transcriptomiques dédiées aux plantes. Leur objectif est alors de fournir aux chercheurs un soutien méthodologique et une expertise dans le domaine des puces à ADN.

L'analyse des profils d'expression des gènes par les puces à ADN est particulièrement adaptée à la caractérisation fonctionnelle de mutants d'origines diverses (insertion, naturel, délétion, antisens, sur-expression). La comparaison des profils d'expression de mutants et de plants sauvages mène aux gènes dont l'expression est modulée par la mutation (Brodersen *et al.* 2002 ; Li *et al.* 2002 ; Perez-Amador *et al.*, 2001 ; Petersen *et al.* 2000 ; Tian, 2004 ; Osakabe *et al.* 2002). Les approches « puces à ADN » permettent d'élargir le niveau d'investigation vers des gènes connus dans la fonction analysée, mais surtout vers de nouvelles pistes parfois insoupçonnées. Les raisons de la modulation de l'expression restent néanmoins inconnues par cette approche, ce qui constitue une limite majeure de la technique. Un prolongement des approches « différentielles » consiste à analyser plus précisément les gènes intéressants isolés par cette technique et à comprendre les processus expliquant le différentiel.

Chapitre II

Description histo- morphologique du bourbon pointu

La tradition rapporte qu'un jour le Prophète Mahomet s'éveilla malade. L'Ange Gabriel envoyé par Allah lui offrit alors une boisson noire pour le réconforter. Après avoir bu le breuvage, Mahomet recouvra la santé et sa force de jeune homme. Au point que dans l'heure qui suivit, il désarçonna quarante cavaliers et honora quarante femmes, selon la légende Il appela ce breuvage « ah'wa » qui signifie aujourd'hui « café » en arabe.(Légende de l'Islam, <http://www.cafeologie.com/histoire.asp>)

I Introduction

Les caractéristiques morphologiques du Bourbon pointu ont bien été décrites (Chevalier, 1947, Cramer, 1957). Tous les auteurs le décrivent comme un « arbuste petit, très rameux, à branches souvent fastigiées, à nœuds renflés très rapprochés (...) sur les rameaux aotûés ; feuilles petites, nombreuses, lancéolées ou étroitement oblongues (...), graines plan-convexes, souvent pointues à une extrémité. » (Chevalier, 1947). Son port est particulier, avec une forme de « sapin de Noël » changeant de celui des autres Arabica. La mutation n'affecte ni la phyllotaxie de l'axe principal orthotrope de feuilles opposées décussées, ni celle des rameaux plagiotropes. Néanmoins, les effets de la mutation Laurina demeurent méconnus au niveau cellulaire.

L'architecture aérienne d'une plante est en partie due au fonctionnement de ses méristèmes apicaux caulinaires. Les notions de méristème apical et d'apex doivent être clairement définies : le méristème apical est la partie la plus apicale d'un axe végétatif, où l'initiation de la croissance a lieu (« the inception of growth centres takes place ») (Cutter, 1965 ; Wardlaw, 1957). Composé que de quelques cellules souches méristématiques, il maintient la présence d'une population de cellules en prolifération, tout en assurant la différenciation des organes latéraux. L'organisation du méristème apical peut être décrit selon une stratification horizontale en couches cellulaires (Satina *et al.*, 1940). L'assise externe, nommée *tunica*, entoure un ensemble de cellules plus internes, appelé *corpus*. Chez les dicotylédones, la tunica se compose de deux assises cellulaires, L1 et L2. La L2 peut à son tour être composée de plusieurs assises, en fonction du stade de développement. A cette description, se superpose une description radiale. Trois domaines, ou zones, ont été définis : la zone centrale (ZC), la zone périphérique (ZP) et la zone médullaire (ZM). La ZC occupe le sommet du méristème et s'étend en profondeur sur une partie de la tunica et du corpus. Elle est entourée de la ZP où naissent les primordia. Sous-jacente à la ZC et à la ZP, la ZM constitue la base du méristème et est composée de cellules plus grandes, organisées en files, produisant les parties internes de la tige.

L'apex englobe le méristème apical, ainsi que toute la zone de croissance et d'élargissement de la tige avec les nouveaux organes (primordia et bourgeons). Dans le cas des caféiers, l'apex est limité à l'extérieur par le « bulbe » terminal limité par une paire de stipules. Le fonctionnement du méristème apical est marqué par l'édification répétitive d'unités folio-caulinaires (feuilles, bourgeons axillaires et entre-nœuds) dans un système

itératif (article de synthèse de Steeves et Sussex, 1989 ; Sussex, 1989). Le temps qui sépare l'initiation de deux feuilles successives est nommé « plastochrone » alors que le temps qui sépare l'émergence macroscopique de ces deux feuilles est nommé « phyllochrone ». Les variations de port entre Bourbon et Bourbon pointu pourraient être attribuées à la modification d'un ou de plusieurs paramètres affectant le méristème apical et l'apex. Le but de la première partie a été d'étudier le cycle d'émergence des feuilles chez le Bourbon, au niveau macroscopique et cellulaire, puis de regarder quels étaient les effets de la mutation Laurina à ces niveaux.

L'activité méristématique de la région sub-apicale du méristème est très importante dans la croissance de la tige (Sachs, 1965). Les cellules-source des entre-nœuds proviennent d'une ou plusieurs couches cellulaires en dessous du méristème (Lyndon, 1987 ; Zobel, 1989). Les phénomènes expliquant le nanisme peuvent donc être recherchés, non dans le méristème lui-même mais dans les zones inférieures de croissance. Deux raisons peuvent être invoquées pour expliquer une faible taille, les deux pouvant agir en synergie : un nombre de cellules par unité de longueur plus faible chez BP, ce qui mettrait en jeu une division cellulaire moins importante, ou des cellules bien plus petites en longueur, ce qui impliquerait une élongation cellulaire affectée. La seconde partie de l'étude a donc cherché à comprendre les effets de la mutation Laurina sur la croissance de la tige, en terme de division et d'élongation cellulaire.

Si le nanisme induit par la mutation Laurina affecte de la même manière les axes plagiotropes et l'axe orthotrope, seul un phénomène de miniaturisation du Bourbon serait observé. Ce phénomène est d'ailleurs observé chez un autre mutant nain, la variété Caturra (Chevalier, 1947). Le Bourbon pointu est plus petit, mais il a aussi un port différent. La troisième partie de cette étude a été de comprendre quelles modifications induites par la mutation Laurina aboutissaient à un port pyramidal. Pour expliquer l'effet de mutation sur le port, des mesures d'angles ont été réalisées entre les axes plagiotropes et orthotropes et la croissance relative des différents axes a aussi été prise en considération.

Les hormones végétales ou phytohormones sont impliquées à tous les stades de la vie d'une plante depuis la pollinisation provoquant la fécondation et le développement de l'embryon zygotique, au développement en plante adulte et jusqu'au contrôle de la floraison, de la fructification et de la sénescence. La première hormone mise en évidence fut l'auxine (premiers travaux de Darwin dès 1870, Paal en 1918, Söding en 1923-1925 puis Went en 1928). D'autres hormones végétales ont été découvertes depuis : chronologiquement il s'agit

des gibbérellines (par Kurosawa en 1926), des cytokinines (par Folke Skoog vers 1950 – Skoog et Armstrong, 1970-), de l'éthylène (acceptée en tant qu'hormone en 1960- Thimann, 1974-), de l'acide abscissique (par Ohkuma et collaborateurs en 1963) et dernièrement des brassinostéroïdes (par Grove et collaborateurs, 1979 ; article de synthèse Asami *et al.*, 2005).

Les mutations bloquant la synthèse, l'utilisation ou accélérant la dégradation de l'acide gibbérellique (GA) conduisent souvent à un phénotype nain. Ceci a été démontré par les études pionnières de Brian et Hemming (1955) et Phinney (1956) chez les mutants nains de pois et de maïs. Depuis, l'application de GA à de nombreux mutants nains de dicotylédones herbacées (Reid, 1986 ; Ross, 1994 ; Weller *et al.*, 1994) mais aussi de ligneux (Sommer *et al.*, 1999a) a effectivement restauré le type sauvage. Ces mutants sont classés comme « GA-sensitive » et sont le plus souvent atteints dans la biosynthèse de la GA. Afin de vérifier une modification liée aux GAs chez le Bourbon pointu, nous avons recherché quels étaient les effets d'application de GAs exogènes sur des plants de Bourbon et Bourbon pointu

II Matériel et méthodes

II.1 Matériel végétal

La variété souche *C. arabica* var. Bourbon (B) et son mutant *C. arabica* var. Laurina (ou Bourbon pointu BP) ont constitué le matériel végétal utilisé lors de nos expériences.

Trois lots de jeunes plantes ont été utilisés lors des expériences concernant la comparaison des apex :

- Le premier lot a compris 19 jeunes plants végétatifs de Bourbon pointu et 14 jeunes plants végétatifs de Bourbon, âgés de 18 mois environ. Après semis, ils ont été placés en serre à l'IRD de Montpellier (France). Les conditions environnementales ont été réglées pour être de 80% d'humidité relative, 26°C durant le jour et 22°C durant la nuit. Ces plants ont été utilisés pour des analyses histologiques des méristèmes apicaux caulinaires de l'axe principal ;

- Le second lot a renfermé dix jeunes plants de chaque, tous issus eux aussi de la culture en serre de l'IRD de Montpellier. Ils ont servis à estimer la vitesse de croissance dans cet environnement ;

- Le dernier lot avec aussi dix plants de Bourbon et de Bourbon pointu, prélevés en champs au stade cotylédonaire, a été placé sous ombrière à Bassin plat (station CIRAD, Saint Pierre, île de la Réunion). Les conditions y ont été de 26,6°C durant la journée et 20,4°C

durant la nuit. L'humidité relative y a varié de 62 % (14h00) à 82 % durant la nuit. Ils ont servi à estimer la vitesse de croissance dans ce second environnement.

Lors de l'étude sur la longueur des entre-nœuds, les expériences ont été réalisées à deux emplacements géographiques : 1) dans les serres tropicales de l'IRD de Montpellier, et 2) sous ombrière à Saint Pierre à l'île de la Réunion. Dans une première expérience, dix jeunes plants de chaque variété ont été observés cinq mois après semis. Dans la seconde expérience, des plants de 18 mois semés en serre ont été étudiés.

Enfin, les notations sur le port de l'arbre ont été effectuées en champs aux Makes à l'île de la Réunion (897m d'altitude) sur des arbres en âge de fructifier (plantés en 2003). Elles ont été prises sur cinq plants de Bourbon et de Bourbon pointu.

II.2 Coupes histologiques

Les apex caulinaires ont été placés dans une solution de 66% chloroforme, 33% de méthanol et 1% d'acide chlorhydrique durant cinq minutes. Ils ont ensuite été rincés dans deux bains successifs d'éthanol et d'eau, de cinq minutes chacun. Les tissus ont ensuite été fixés au minimum une nuit entière dans une solution de 2 % de glutaraldéhyde, 2 % de paraformaldéhyde, 1 % de caféine et 0,2 M de tampon phosphate. Par la suite, ils ont été déshydratés dans des bains d'éthanol de plus en plus concentrés, puis inclus dans la résine (Tchenovitt 7100) en utilisant le protocole décrit par Buffard et collaborateurs en 1992. Les blocs obtenus ont été coupés à 3µm d'épaisseur en utilisant un microtome de la marque HISTORANGE (LKB Broma). Une double coloration (acide périodique-schiff –PAS- et Naphtol Blue Black -NBB-) a été utilisée : les protéines solubles et insolubles ont été spécifiquement colorées par le NBB (Fisher 1968), alors que les composés carbohydratés ont été colorés en rouge par le PAS (Martoja et Martoja 1967). Les coupes ont été observées en lumière conventionnelle et photographiées. Les mesures de distance ont été estimées en utilisant le logiciel ImageJ (Wayne Rasband; wayne@codon.nih.gov).

Lors de l'observation de matériel frais (entre-nœuds), ce dernier a été directement fixé avec de la colle forte sur le plateau du microtome HM 650V (MICROM International). Les coupes de 20µm d'épaisseur faites avec les lames vibrantes de la marque "Schick Injector" ont été immédiatement observées sous lumière conventionnelle à partir du microscope à transmission DM 6000 Leica.

Les images ont été acquises pour chaque coupe en utilisant le logiciel OPENLAB (Improvision UK) et les données traitées en utilisant le logiciel VOLOCITY (Improvision UK)

sur le site <http://www.improvision.com/>). Pour toutes les observations, deux objectifs au microscope ont été utilisés : Obj x10, ouverture numérique = 0.30 HP PL Fluotar (Ref LEICA 11506505) et l'objectif x20, ouverture numérique = 0.70 HC Plan APO (Ref LEICA 11506166).

II.3 Notations et analyses faites sur les apex caulinaires

II.3.1 Observations microscopiques

Les mesures sont exprimées en micromètres. Pour les apex présentant des primordia se développant autour du méristème, huit mesures ont été prises (Figure II.1) :

- D1 : diamètre à la base des deux derniers primordia formés,
- D2 : diamètre de l'apex au niveau du point le plus au centre du méristème,
- D3.1 et D3.2 : largeurs des primordia,
- D4 : longueur entre les primordia,
- H1.1 et H1.2 : hauteurs des initiums pris perpendiculairement à partir de D2,
- H2 : hauteur de D2 à D4.

Ces mesures ont permis d'obtenir $D3 = (D3.1 + D3.2)/2$ et $H1 = (H1.1 + H1.2)/2$.

Pour les apex n'ayant pas d'initium, seules deux mesures ont été prises : D1 et H2

II.3.2 Observations macroscopiques

Les observations macroscopiques ont concerné la vitesse d'émergence des entre-nœuds. Cette mesure a été prise en deux environnements différents (La Réunion en ombrière et Montpellier en serre), à partir de plantes du même âge (cinq et six mois). Seuls deux caractères ont été notés à chaque fois, le nombre d'entre-nœud (EN_N) et la taille de la plante (au dessus de l'hypocotyle). La vitesse d'émergence a été calculée en fonction du nombre d'entre-nœuds apparus en un mois, et de même la vitesse de croissance a été calculée en fonction de l'accroissement des plantes sur le même laps de temps.

II.3.3 Analyses statistiques

Deux méthodes statistiques ont été utilisées :

- La régression par la méthode des moindres carrés non linéaires. Elle a permis l'ajustement deux à deux des variables mesurées à des relations d'allométrie, selon la fonction de type « $Y = a * X^b + c$ ». La validation du modèle a été faite avec la vérification de l'homoscédasticité et l'absence de relation entre résidus et valeurs attendues ;

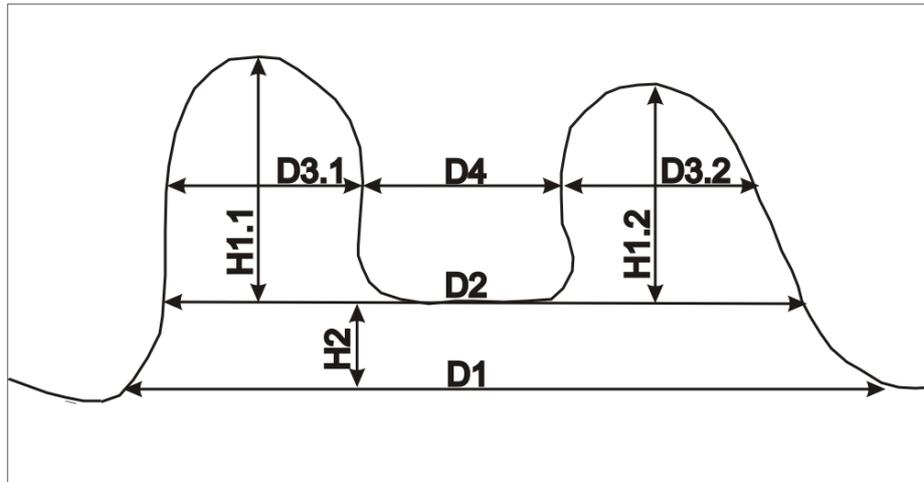


Figure II.1 : Représentation schématique d'un méristème avec ses primordia permettant de visualiser les mesures prises.

- L'analyse de variance (ANOVA). Deux modèles équilibrés avec des facteurs fixes ont été utilisés : à un ou deux facteurs. Ils ont servi à rechercher les différences existant entre B et BP, et le second a permis aussi de tester les effets de l'environnement.

Les résultats ont été analysés avec le logiciel Statistica (6.1 version, 2004 pour Microsoft Windows).

II.4 Expériences sur la longueur des entre-noeuds

Pour un plant donné, les entre-nœuds ont été numérotés de $i = 0$ (hypocotyle) à K . Quatre expériences ont été menées avec leurs propres objectifs :

II.4.1 Comparaison des variétés au stade juvénile

Le but de cette expérience a été de comparer des jeunes plants de Bourbon et Bourbon pointu dans deux conditions environnementales (serre à Montpellier et ombrière à Saint Pierre) à l'âge de cinq mois, c'est-à-dire deux mois après le stade cotylédonaire. La comparaison entre les deux variétés a aussi été faite à 18 mois mais uniquement à Montpellier.

A chaque observation, le nombre et la longueur des entre-nœuds, incluant l'hypocotyle, ont été notés.

II.4.2 Origine des différences observées au niveau de la taille de l'axe orthotrope

Les observations macroscopiques ont concerné l'axe orthotrope principal. Elles incluent la hauteur de la plante (Pl_H) et les longueurs des entre-nœuds K (EN_{K_L}) et $K-2$ (EN_{K-2_L}). Les mesures ont été exprimées en millimètres.

Quatre emplacements de l'axe principal orthotrope ont fait l'objet d'observations microscopiques. Ces positions sont numérotées par rapport au sommet du plant :

- E1 : dans l'entre-nœud K , à 5mm sous le méristème apical caulinaire, à un emplacement où les divisions cellulaires sont toujours très présentes,
- E2, E3 et E4 : dans l'entre-nœud $K-2$, respectivement à son sommet, à son milieu et à sa base. Les cellules de ces zones commencent à se lignifier et ne se divisent quasiment plus.

Les mesures (en μm) et le comptage de cellules ont été effectués sur la moelle de la tige. Elles ont inclus :

- La largeur des cellules (Cell_Larg_{Li}) ;
- La hauteur des cellules (Cell_Ht_{Li}) ;
- Le diamètre de la moelle (Dm_{Li}).

L'indice « i » dans le « Li » a indiqué l'endroit de la coupe ($i = 1$ à 4). Pour chaque échantillon, les valeurs estimées de Cell_Larg_{Li} et Cell_Ht_{Li} ont été les moyennes calculées à partir des longueurs et largeur de plus de 40 cellules.

Le nombre de cellules présentes en largeur dans la moelle de l'entre-nœud K-2 a été compté et noté Dm3_Cell_N .

Enfin certaines variables ont été estimées à partir des variables observées. Il s'agit de l'indice de forme cellulaire ($\text{Cell_Form}_{Li} = \text{Cell_Ht}_{Li}/\text{Cell_Larg}_{Li}$), du nombre de cellules en largeur dans la moelle de l'entre-nœud K ($\text{Dm}_{L1_Cell_N} = \text{Dm}_{L1}/\text{Cell_Larg}_{L1}$), du nombre de cellules en largeur dans la moelle de l'entre-nœud K-2 ($\text{Dm}_{K-2_Cell_N} = \text{Dm}_{L3}/\text{Cell_Larg}_{L3}$), du nombre de cellules en hauteur dans l'entre-nœud #K ($\text{EN}_{K_Cell_N} = \text{EN}_{K_L}/\text{Cell_Ht}_{L1}$) et du nombre de cellules en hauteur dans l'entre-nœud #K-2 ($\text{EN}_{K-2_Cell_N} = \text{EN}_{K-2_L}/\text{Cell_Ht}_{L3}$).

Toutes ces annotations pour les variables sont résumées dans le tableau II.1

II.4.3 Analyse macroscopique sur les variations de port entre les deux variétés

Les observations ont été faites en champs sur cinq plantes de chaque variété, âgées environ de deux ans et demi. Deux types de mesures macroscopiques peuvent expliquer les variations de port :

Le premier est l'angle entre les axes plagiotropes et l'axe orthotrope (angle α) (Figure II.2). Quatre mesures par plants ont été relevées (en degré), sur des nœuds différents pour chaque plant. Ces angles ont par ailleurs toujours été mesurés dans le tiers supérieur de l'arbre sur des rameaux ne portant pas de fruits.

Le second est le rapport entre les longueurs des entre-nœuds des plagiotropes et de l'orthotropes à différents niveaux (Figure II.2). Les entre-nœuds des axes orthotropes et plagiotropes de plants ont été numérotés ici à partir de leur sommet respectif (premier entre-nœud à partir du sommet numéroté 1) et les mesures suivantes ont été effectuées :

Tableau II.1 : Annotations dans le texte pour les observations

Variable	Annotations
Hauteur de la plante	Pl H
Longueur de l'entre-nœud 1	K L
Longueur de l'entre-nœud 1	K-2 L
Largeur de cellule à la position L_i	Cell Larg $_{L_i}$
Hauteur de cellule à la position L_i	Cell Ht $_{L_i}$
Indice de forme cellulaire	Cell Form $_{L_i}$
Diamètre de la moelle à la position L_i	Dm $_{L_i}$
Nombre de cellule en largeur dans la moelle de l'entre-nœud K	Dm $_{K}$ Cell N
Nombre de cellule en largeur dans la moelle de l'entre-nœud K	Dm $_{K-2}$ Cell N
Nombre de cellules en hauteur dans l'entre-nœud K	EN $_{K}$ Cell N
Nombre de cellules en hauteur dans l'entre-nœud K-2	EN $_{K-2}$ Cell N

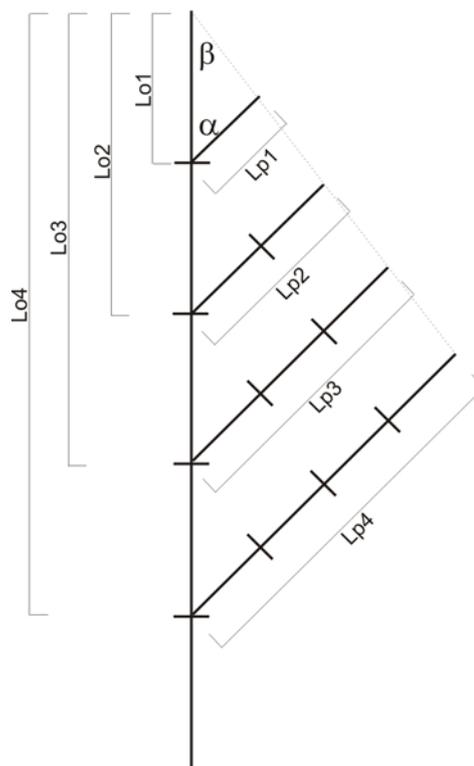


Figure II.2 : Diagramme montrant les différentes mesures faites au sommet de chaque plant.

- Lo_i : longueur de l'axe orthotrope de son sommet à la base de l'entre-nœud "i", avec « i » numéro de l'entre-nœud variant de 1 à 4 ;

- Lp_i : longueur moyenne des deux axes plagiotropes situées à la base de l'entre-nœud « i », avec « i » variant de 1 à 4.

Lo_i et Lp_i permettent de calculer le rapport $R_i = Lp_i/Lo_i$.

A partir de cet angle α et du ratio R_4 , il est possible de calculer l'angle β (Figure II.2) :
 $\text{tang}(\beta) = R_4 \sin \alpha / (1 - R_4 \cos \alpha)$

Enfin, des coupes microscopiques longitudinales ont été effectuées au milieu du dernier entre-nœud de l'axe orthotrope, mais aussi sur celui des axes plagiotropes situés à la base du premier et troisième entre-nœud (P_1 et P_3). Elles ont permis de mesurer la longueur et la largeur des cellules.

II.4.4 Analyses statistiques sur les variations de longueur d'entre-nœud et d'architecture de l'arbre

II.4.4.1 Origine des différences observées au niveau de la taille de l'axe orthotrope

L'analyse statistique des variables Pl_H , K_L , $K-2_L$, $Dm_K_Cell_N$, $Dm_{K-2}_Cell_N$, $EN_K_Cell_N$ et $EN_{K-2}_Cell_N$ a eu pour objectif de tester la présence de différences entre B et BP. Elle a utilisé un modèle fixe, équilibré, à un facteur d'analyse de la variance.

L'analyse statistique des variables $Cell_Larg$, $Cell_Ht$ et $Cell_Form$ a eu pour objectif de tester, outre la présence de différences entre B et BP, celles concernant les variations liées à la position (L1, L2, L3 et L4) ainsi que l'interaction « variété x position ». Elle a utilisé un modèle fixe, équilibré, à deux facteurs croisés d'analyse de la variance.

Le test de Tukey (« Honestly Significant Difference ») a permis de classer les moyennes lorsque l'effet a été significatif.

II.4.4.2 Analyses concernant les variations de port

Plusieurs modèles d'analyse de variance ont été utilisés :

- le modèle fixe et équilibré, à un facteur pour tester les différences entre B et BP sur les variables Lo_4 ,

- le modèle croisé, fixe et équilibré sur les variables R_i afin d'y tester les différences entre B et BP, entre emplacements de l'entre-nœud le long de l'axe orthotrope et d'interaction entre ces deux derniers facteurs,

- le modèle hiérarchisé, équilibré, mixte pour tester les différences entre plants à l'intérieur d'une variété et les différences entre variété sur les mesures concernant les angles.

Le test de Tukey (« Honestly Significant Difference) a permis de classer les moyennes lorsque l'effet est significatif.

Pour chacune des variétés, la relation exponentielle de type « $y = a.e^{bx} + c$ » entre la variable R_i et la position « i » sur l'axe orthotrope a été ajustée par la méthode des moindres carrés non linéaires.

Les résultats ont été analysés avec le logiciel Statistica (6.1 version, 2004 pour Microsoft Windows)

II.5 Action de la gibbérelline exogène

L'expérience a été réalisée sur des plantes âgées de six mois depuis leur introduction en ombrière à Bassin plat de la station du CIRAD (Saint Pierre, île de la Réunion). Les surfaces aériennes de sept plants de chacune des deux variétés ont été aspergées par une solution de 100 ppm (soit 29 mM) d'acide gibbérellique (sigma réf. G-7645). Le traitement a eu lieu tous les trois jours durant un mois. Un même nombre de plantules, utilisées comme témoin, ont été aspergées par de l'eau. Trois dates d'observation ont été définies : le jour du premier traitement (T0), du dernier traitement (T1) et un mois après (T2).

A chaque date d'observation, cinq variables ont été prises en considération :

- Le nombre d'entre-nœuds ;
- La longueur des entre-nœuds K-2, K-1 et K ;
- La somme des longueurs de ces trois entre-nœuds.

Cette analyse statistique date par date des variables prises en compte a eu pour objectif de tester, outre la présence de différences entre B et BP, celles concernant les variations dues à l'application de gibbérelline exogène, ainsi que l'interaction « variété x traitement ». Un modèle fixe, équilibré, à deux facteurs croisés d'analyse de la variance a été retenu.

Enfin, des mesures foliaires de longueur et de largeur ont été réalisées trois mois après T0 sur les témoins et les plants traités, aussi bien chez B que chez BP. Il y a eu six plants observés par combinaison « variété x traitement », excepté pour le Bourbon témoin (cinq

plants seulement). Ces deux dimensions ont ensuite permis le calcul de l'indice de forme Longueur/Largeur.

III Résultats

III.1 Fonctionnement de l'apex chez C. arabica var. Bourbon

Le fonctionnement de l'apex a été observé de trois façons : 1) description macroscopique de l'initiation et du développement complet d'un phytomère (unité de base d'une tige composée d'une feuille, d'un nœud et d'un entre-nœud), 2) description de coupe de l'apex, 3) analyses de coupes microscopiques de l'apex.

III.1.1 Description macroscopique de l'initiation et du développement d'un phytomère

L'origine chronologique du temps (T0) a été défini comme le moment où les feuilles Lf1 (figure II.3) sont totalement développées et écartées, avec le sommet de l'apex formé uniquement des stipules interpétiolaires S1. Quatre phases ont pu être observées durant un cycle d'émergence de feuilles :

- 1) Phase de latence (ϕ_1) où l'apex ne montre aucune modification extérieure ;
- 2) Apparition d'un couple de feuilles Lf2, accolées entre les stipules S1, sans que leur pétiole soient visibles (ϕ_2) ;
- 3) Croissance des feuilles Lf2, accolées, et émergence de leurs pétioles. Durant cette phase, les stipules suivantes (S2) et le nouvel entre-nœud commencent à apparaître (ϕ_3) ;
- 4) Séparation puis aplanissement des feuilles Lf2, jusqu'à atteindre de nouveau le temps T0. En parallèle, il y a croissance des feuilles LF2 et du nouvel entre-nœud (ϕ_4).

Le temps séparant l'initiation de deux étages successifs de feuilles (phyllochrone) a été estimé à partir du taux d'émergence de feuilles. A Montpellier, deux entre-nœuds et demi sont apparus entre le cinquième et le sixième mois, soit 32% de plus qu'à Saint Pierre ($F_{1,18} = 9,52$; $p = 0,006$). La durée du cycle a été de 12 et 16 jours respectivement à Montpellier et à Saint Pierre.

Durant le phyllochrone, l'accroissement de la taille de la plante n'a pas changé entre les deux environnements ($F_{1,18} = 3,28$; $p = 0,09$). Cela donne une estimation commune de 11,2 cm pour les deux localisations. Quand l'accroissement de la plante (sans impact de l'environnement) est divisé par le taux d'émergence des feuilles (avec un impact de

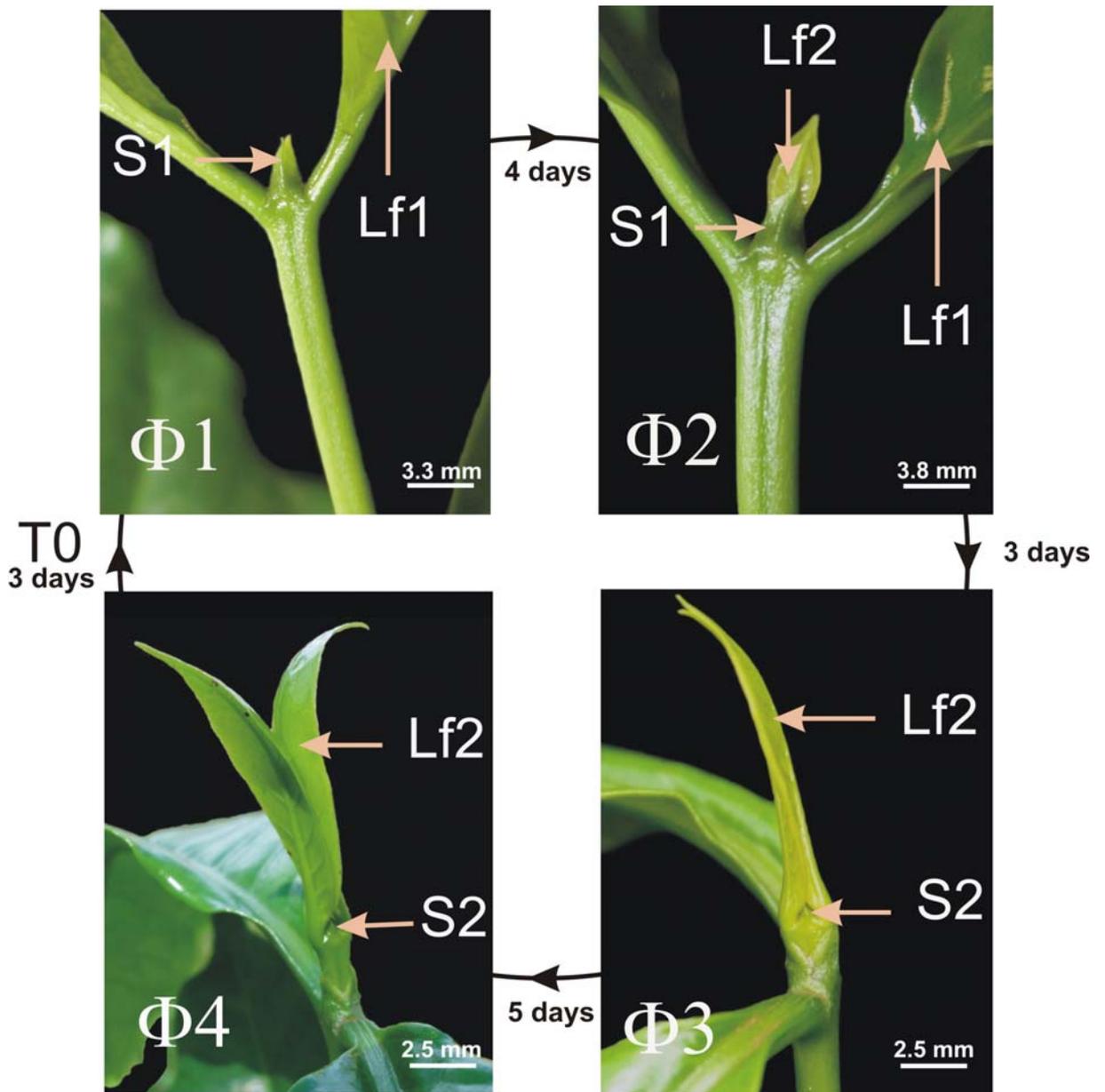


Figure II.3 : Phases macroscopiques (Φ1 à Φ4) d'émergence de feuille chez *C. Arabica* var. Bourbon. Lf1 et Lf2 : feuilles émises avec leurs stipules (S1 et S2) respectifs.

l'environnement), il est attendu, et ceci a été vérifié, que l'environnement (facteurs positifs et négatifs) a eu un impact sur ce rapport ($F_{1,18} = 8,92$; $p = 0,008$). L'accroissement moyen d'un entre-nœud a été de 4,2 et 6,7 cm respectivement à Montpellier et à Saint Pierre.

III.1.2 Description de coupes de l'apex

L'absence de modifications externes durant la phase de latence ($\phi 1$) ne signifie pas l'absence d'un processus de croissance à l'intérieur du dôme formé par les stipules S1. La figure II.4A montre une coupe du sommet de l'axe orthotrope à T0. Les stipules S1, les feuilles Lf2 et le méristème constituent « l'apex ». Les stipules S1 forment son enveloppe externe et protègent les jeunes feuilles Lf2. A la base des Lf2, deux stipules S2 ont été initiées qui, au cours du développement, protégeront à leur tour l'apex comme les S1. Dans la figure II.4B, l'apex est en phase $\phi 2$. Les plus jeunes feuilles sont apparues entre les stipules S1, les stipules S2 étant maintenant totalement visibles. Dans la figure II.4C, les primordia (P) émergent, tandis que la figure II.4D représente une coupe transversale schématique de l'apex. Les primordia se développent en ébauches foliaires durant les phases $\phi 3$ et $\phi 4$, clôturant le cycle. Le méristème apical émet régulièrement et invariablement des organes qui se développent sans dormance.

III.1.3 Description microscopique de l'apex

D'après les résultats précédents, les prélèvements d'apex pour les observations microscopiques ont été menés à deux moments du cycle macroscopique : 1) de $\phi 4$ à $\phi 1$, quand le méristème ne montre ni initium, ni primordia foliaire, et 2) durant $\phi 1$, quand les initiums mis en place sont en cours de développement en primordia.

De $\phi 4$ à $\phi 1$, le méristème apical est en forme de dôme et mesure $45\mu\text{m}$ (H2) et $262\mu\text{m}$ (D1) en moyenne (Figure II.5A). Les deux couches externes, L1 et L2, sont clairement visibles avec des divisions anticlines (en particulier pour la L1). Les cellules sont de forme carrée à rectangulaire avec un noyau volumineux (coloration bleue intense). La profondeur du méristème varie de cinq cellules au centre à deux dans la zone périphérique. Sur la figure, des stipules sont en formation juste au dessus du méristème et commencent à émettre des trichomes.

Les premières modifications sont observées au niveau des cellules de la couche externe L1 : les cellules sont plus petites avec des noyaux peu visibles. Leurs divisions ont abouti à la formation d'une paire d'initiums foliaires diamétralement opposés. Dans la zone

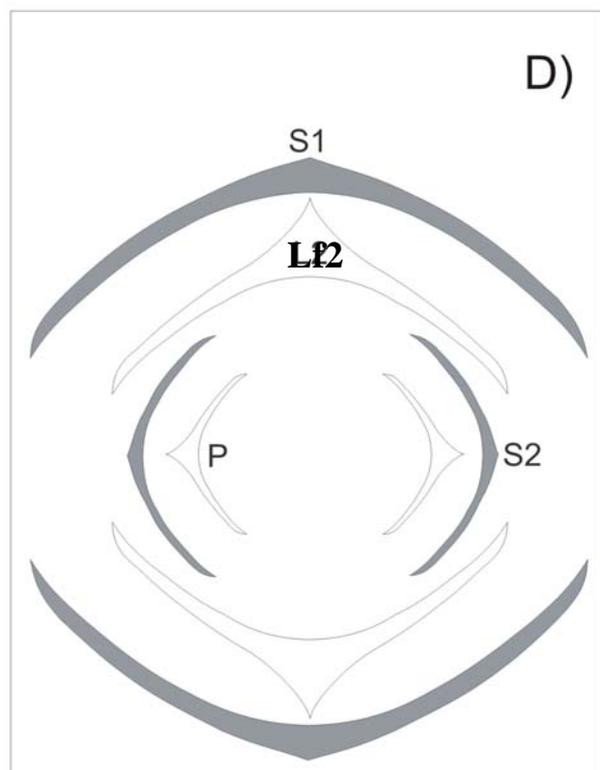
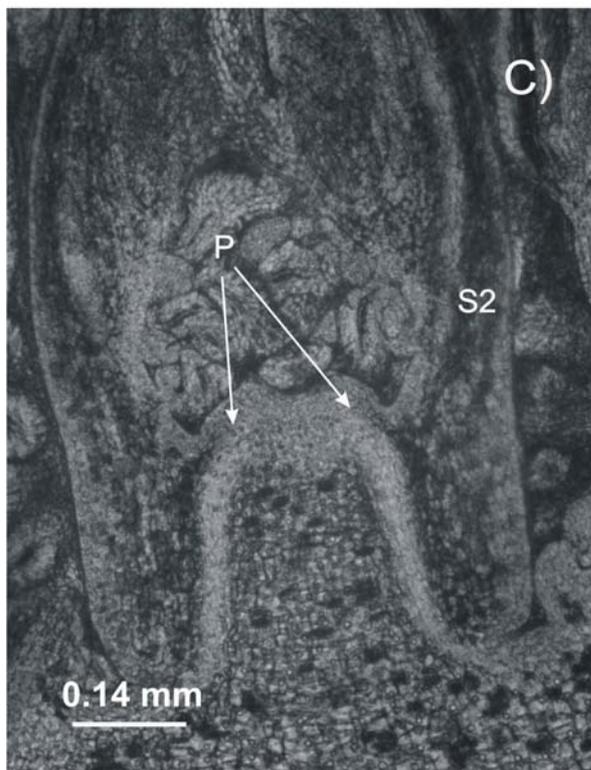
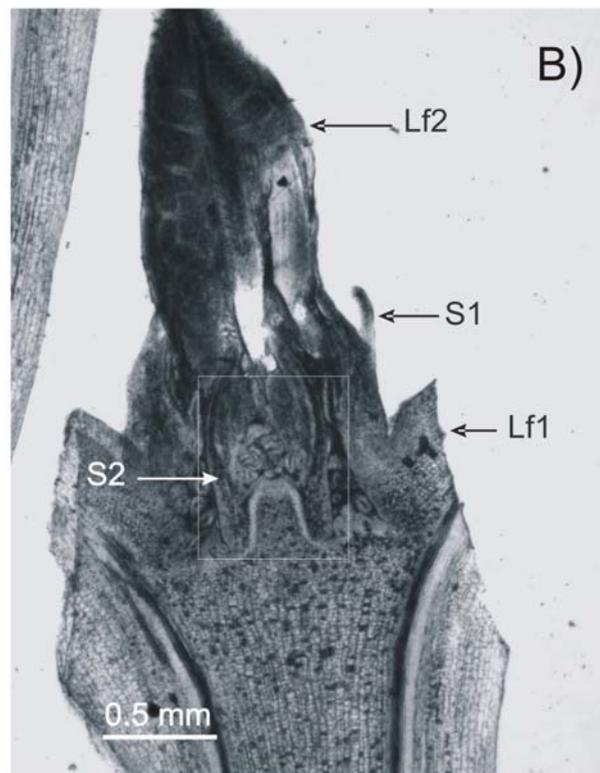


Figure II.4 : Description de l'intérieur de l'apex. A) apex à T0 avec les stipules S1 protégeant les feuilles Lf2. B) Emergence des feuilles Lf2 entre les stipules S1. C) Grossissement du méristème correspondant à la photo B et montrant les primordia foliaires P. D) Représentation schématique de l'apex en vue de dessus.

périphérique, le futur cordon provasculaire, apparu très précocement et à l'origine des futures cellules conductrices, est formé de cellules étroites au cytoplasme dense, formant une file continue. A ce stade de développement, la zone centrale est toujours nette, avec des noyaux peu visibles à l'intérieur des cellules. Le méristème est alors en forme de trapèze (Figure II.5B). Sa base D1 et sa hauteur montrent respectivement un accroissement de 27 et de 70% (Tableau II.2).

Les initiums ont poursuivi leur croissance pour se transformer en primordia foliaires, puis en ébauches foliaires. (Figure II.5C, tableau II.2). Une activité cellulaire intense s'observe alors à l'aisselle du primordium foliaire le plus développé. Les cellules de cette zone ne tardent pas à s'organiser en prenant le même aspect que le méristème apical avec une zonation spécifique. Cette activité sera à l'origine du développement d'axes plagiotropes. Depuis le moment où le méristème est en dôme jusqu'à cette phase de développement, le diamètre de l'apex (D1) et sa hauteur (H2) se sont accrus respectivement de 71 et 112 %. En revanche, le rapport D2/D1 reste inchangé (81%).

Les ébauches foliaires ont par la suite continué de croître (Figure II.5D). A cette étape, leur taille est similaire à celle du diamètre D1. En particulier, la distance D4 entre les ébauches foliaires, estimation du diamètre du méristème D1 du prochain cycle, est de 127 μ m en moyenne, soit la moitié de D1 sur la figure II.5A. Au sommet des nouvelles formations foliaires, des trichomes connectés avec la face épidermique interne des stipules montrent une structure en glandes sécrétrices bien individualisées. D'après la coloration rose, leur sécrétion est de nature polysaccharide. Par la suite, les ébauches foliaires se sont divisées en deux parties, l'une étant relativement plus étroite par rapport à l'autre. De l'évolution de la partie proximale naîtra une zone relativement élargie et enveloppante constituant les stipules. La partie distale, par sa croissance en longueur et légèrement en largeur, constituera le limbe de la jeune feuille.

III.2 Les impacts de la mutation Laurina sur les différents paramètres relatifs à l'apex

III.2.1 Sur le plastochrone et l'accroissement en taille de la plante

L'impact de la mutation Laurina sur le plastochrone dépend de l'environnement ($F_{1,36} = 5,24$; $p = 0,028$). A Montpellier, le taux d'émergence des feuilles est supérieur de 39% chez le Bourbon, alors qu'il est similaire pour BP et B à Saint Pierre.

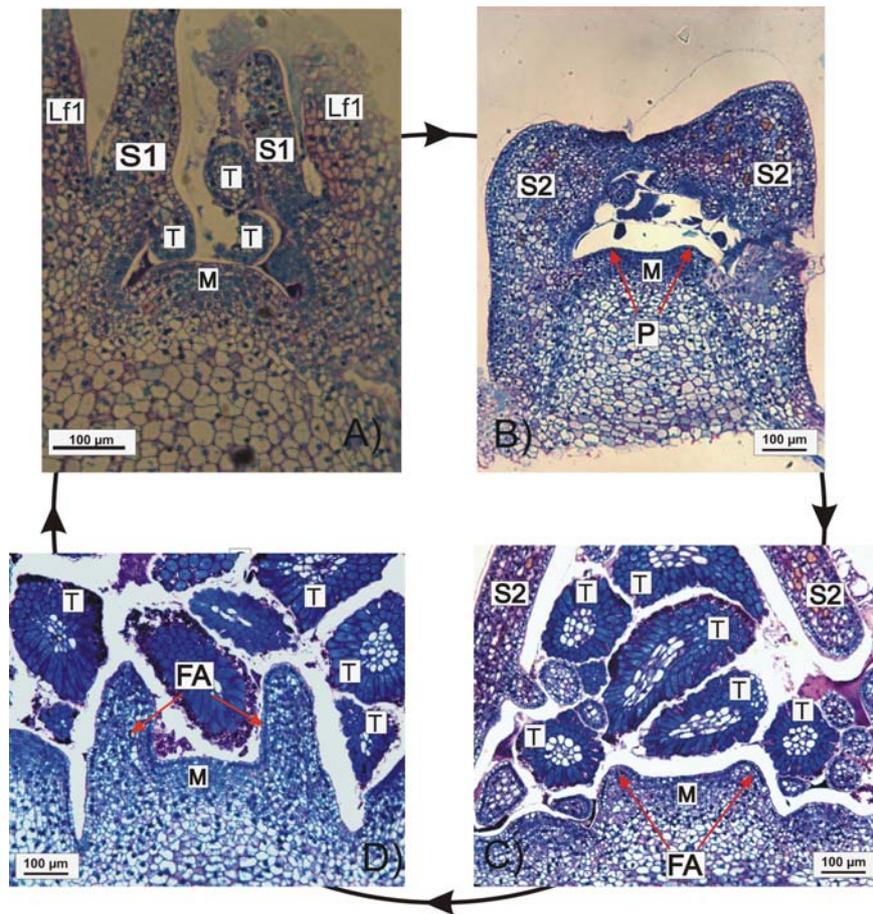


Figure II.5 : Description microscopique de l'apex au niveau du méristème. A) Méristème en forme de dôme, B) Emergence des primordia au niveau du méristème, C) Développement des primordia en petites ébauches foliaires, et D) Développement des petites ébauches foliaires en larges ébauches foliaires. Lf1 : feuille numéro 1 avec ses stipules S1 ; S2 : stipule numéro 2 ; M : méristème ; P : primordium ; FA : ébauche foliaire ; T : trichome

Tableau II.2 : Principales caractéristiques de la partie de l'apex composé du méristème apical et des nouvelles feuilles en formation, à différentes étapes du développement.

	Forme trapézoïdale	Petites ébauches foliaires	Larges ébauches foliaires
D1	332	449	595
D2	268	366	500
D3	59,7	96,9	156
D4	94,3	111	127
H1	126	219	614
H2	76,7	95,6	152

L'impact sur la croissance des plantes est nettement plus marqué par rapport à celui sur le plastochrone. La différence entre les types sauvage et muté n'est, en revanche, pas dépendant de l'environnement ($F_{1,36} = 0,39$; $p = 0,53$), ce qui conduit à une conclusion commune aux deux milieux : la croissance est six fois plus importante pour le Bourbon que pour le Bourbon pointu ($F_{1,36} = 114$; $p < 0,000001$).

III.2.2 Sur la structure de l'apex

L'apex terminal au sommet de la tige contient toujours le même nombre d'organes en formation et cela quelle que soit la variété. A une phase donnée, il y a toujours deux paires de feuilles en formation (figure II.6).

III.2.3 Sur les dimensions de l'apex

La mutation Laurina n'a pas d'effet sur la taille du méristème en forme de dôme, que ce soit sur D1 ($F_{1,10} = 0,28$; $p = 0,61$) ou sur H2 ($F_{1,10} = 1,67$; $p = 0,22$). Il n'y a donc aucune différence en ce qui concerne les dimensions du méristème.

Au contraire, une différence apparaît dès que le méristème a une forme trapézoïdale, et cette différence touche toutes les dimensions prises en compte : D1, D2, D3, D4, H1 et H2. Pour H1, largeur de l'ébauche foliaire, l'ANOVA a nécessité une transformation logarithmique des données (Tableau II.3). Pour tous les caractères, aucune interaction « variété*phase » n'est mise en évidence. En d'autres termes, l'impact de la mutation Laurina est similaire quelle que soit la phase dans laquelle se trouve l'apex (forme trapézoïdale, avec des petites ou de larges ébauches foliaires). Dans tous les cas, les dimensions sont plus importantes pour le Bourbon que pour le Bourbon pointu.

La description de l'apex a été divisée en trois types d'observations : 1) D1, D2 et H2 concernant le centre de l'apex *sensu stricto*, 2) D3 et H1 décrivant le développement de l'ébauche foliaire, et 3) D4 par sa relation avec la future largeur du méristème régénéré, c'est-à-dire ayant de nouveau sa forme de dôme.

Les deux diamètres de l'apex D1 et D2 montrent une différence relative constante avec un rapport BP/B de 0,79, quel que soit le stade de développement (Tableau II.4). Ceci contraste avec le comportement de la hauteur H2 de l'apex. Cette dernière présente en effet une plus grande différence variétale, mais surtout, celle-ci change au cours du développement de l'apex.

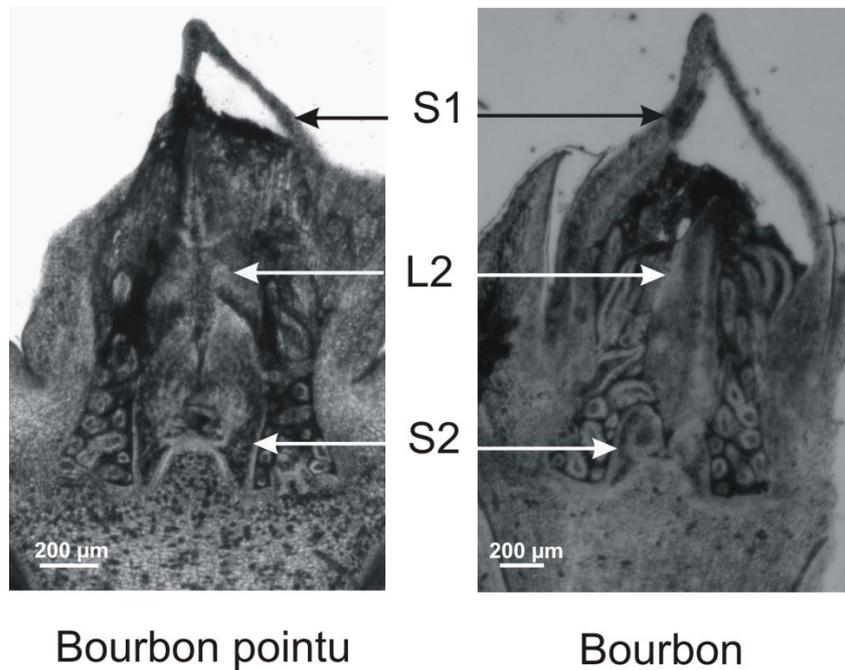


Figure II.6 : Absence de différence dans la structure de l'apex du Bourbon et du Bourbon pointu. S1 : première stipule ; L2 : seconde feuille ; S2 : seconde stipule.

Tableau II.3 : Résultats de des ANOVA a deux facteurs concernant les dimensions prises sur l'apex. Les facteurs sont la variété et la phase de développement.

	Différences variétales		Différences de phases		Interaction	
	F _{1, 27}	p	F _{2, 27}	p	F _{2, 27}	p
D1	32,2	0,000005	42,0	<0,000001	1,13	0,33
D2	24,2	0,00004	38,1	<0,000001	0,95	0,40
D3	16,0	0,0004	38,1	<0,000001	1,74	0,19
D4	25,2	0,00002	17,6	0,00001	0,73	0,49
Log(H1)	29,4	0,00001	55,2	<0,000001	0,11	0,90
H2	47,4	<0,000001	36,0	<0,000001	0,24	0,79

Pour les ébauches foliaires, le comportement de la largeur D3 s'oppose à celui de la hauteur H1. Pour les deux premiers stades, le rapport BP/B pour D3 (0,77 en moyenne) est très proche de celui observé pour D1 et D2 (0,79). En revanche, H1 montre davantage de similitudes avec H2.

Pour la distance D4 entre les deux primordia, la plus grande différence entre BP et B s'observe lorsque le méristème a une forme trapézoïdale (BP/B = 0,61). Cet écart diminue énormément dans les phases suivantes du développement et un ratio BP/B proche de 1 (Tableau II.4) est attendu entre BP et B si l'absence de différence variétale précédemment mise en évidence pour le diamètre du méristème au stade « dôme » est pris en compte. Ce comportement est le même que celui de la hauteur H2.

III.2.4 Sur les relations d'allométrie entre les dimensions de l'apex¹

Toutes les relations entre variables prises deux à deux montrent des relations de type allométrique ($Y = a * X^b + c$). Deux exemples ont été développés ici, le premier concernant les ébauches foliaires ($D3 = f(H1)$), et la seconde, la relation entre la hauteur de l'ébauche foliaire *sensu stricto* (H2) avec le diamètre D1 de l'apex.

Dans le premier cas (figure II.7), une première régression a permis d'obtenir les équations suivantes, respectivement pour le Bourbon pointu et le Bourbon : $H1 = 0,000355(D3)^{2,804} + 8,81$ et $H1 = 0,00152(D3)^{2,500} - 0,139$. Ces résultats suggèrent une valeur commune des paramètres a et b avec $c = 0$. La nouvelle estimation commune à BP et B donne l'équation finale $H1 = 0,00085(D3)^{2,615}$.

Dans le second exemple (figure II.8), une approche similaire aboutit à l'équation commune: $H2 = 0,0066 (D1)^{1,57}$.

¹ Le fait de travailler avec le microtome sur du matériel fixé en résine ou le vibratome sur du matériel frais n'a aucune influence sur la prise de mesure (exemple pour la variable « d1 » : $F_{1,14} = 0,72$; $p = 0,41$)

Tableau II.4 : Rapport « Bourbon pointu/Bourbon » pour les dimensions des apex durant son développement.

	Forme trapézoïdale	Petites ébauches foliaires	Larges ébauches foliaires	Moyenne
D1	0,82	0,78	0,76	0,79
D2	0,80	0,80	0,77	0,79
D3	0,80	0,79	0,72	0,77
D4	0,61	0,69	0,86	0,72
H1	0,54	0,60	0,56	0,57
H2	0,45	0,57	0,66	0,56

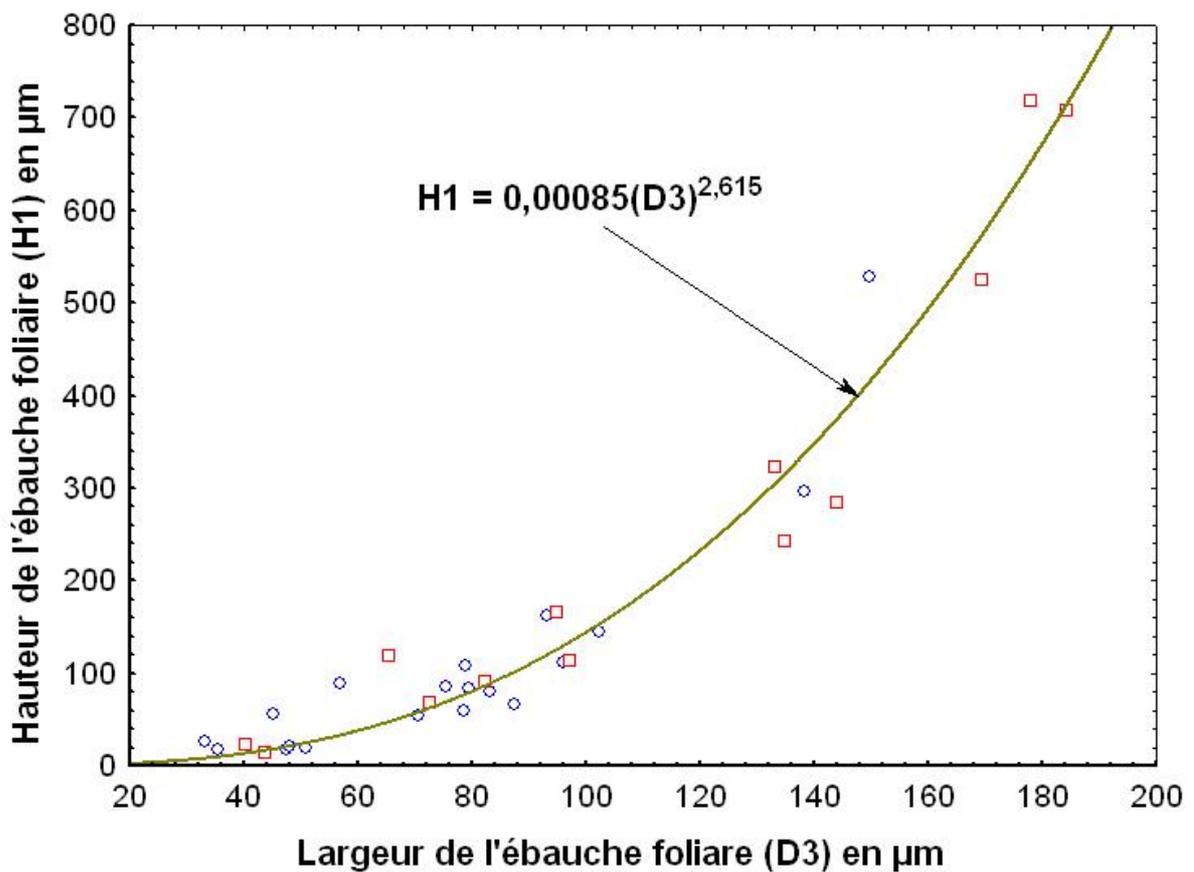


Figure II.7 : Relation d'allométrie existant entre le diamètre (D3) de l'ébauche foliaire (« Leaf anlage width ») et sa hauteur (H1) (« Leaf anlage height ») durant leur développement. Les mesures sont exprimées en µm.

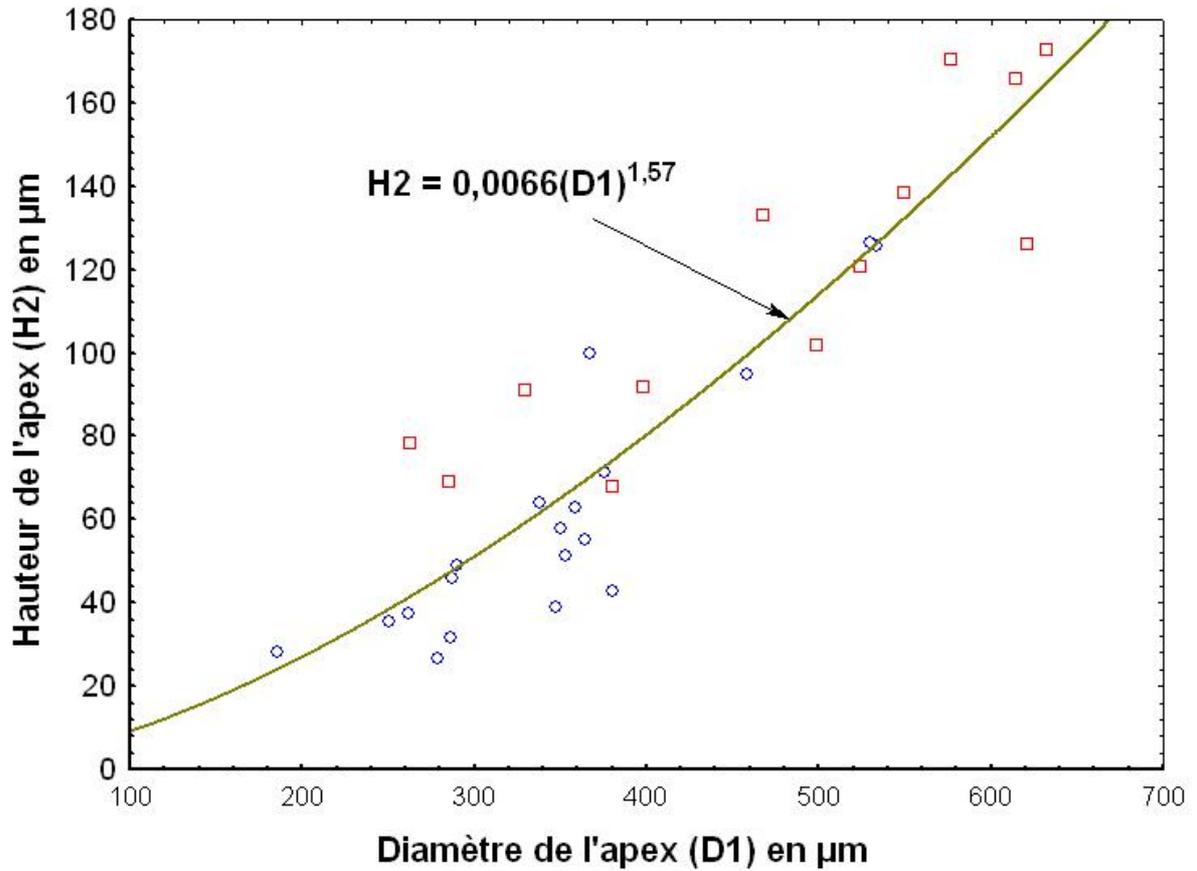


Figure II.8 : Relation d'allométrie existant entre la hauteur de l'ébauche foliaire (H2) (« Shoot apex height) et le diamètre D1 de l'apex (« Shoot apex diameter ») durant le développement. Les mesures sont exprimées en µm.

Tableau II.5 : Résultats des ANOVA a deux facteurs concernant les longueurs d'entre-nœud du Bourbon pointu (BP) et le Bourbon (B) chez de jeunes plants âgés de cinq mois, à Montpellier et à La réunion. Les degrés de liberté ont été $k = 1$ et $k = 36$ pour tous les facteurs et les entre-nœuds 1 à 4. Ils ont été de $k = 1$ et $k = 24$ pour l'entre-nœud 5. Les effets significatifs sont en gras.

	Effet de la mutation		Effet milieu		Interaction	
	F	p	F	p	F	P
Entre-nœud 1	0,12	0,73	0,045	0,95	1,06	0,31
Entre-nœud 2	6,84	0,01	3,72	0,06	0,81	0,37
Entre-nœud 3	195	< 0,00001	0,28	0,60	25,9	0,00001
Entre-nœud 4	105	< 0,00001	2,30	0,14	3,36	0,07
Entre-nœud 5	4,77	0,037	7,44	0,01	0,09	0,77
Hauteur au dessus des cotylédons	115	< 0,00001	13.2	0,0009	2,22	0,15

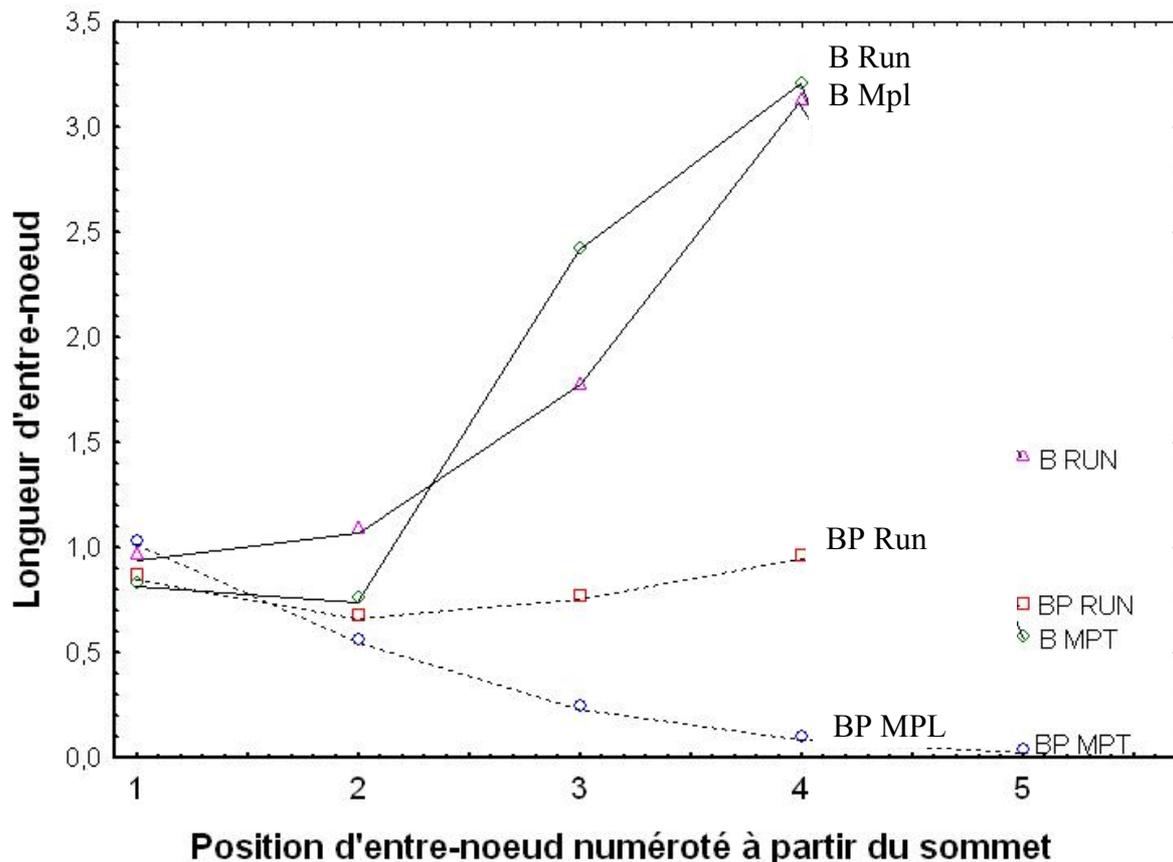


Figure II.9 : Longueurs d'entre-nœud chez les plantes âgées de cinq mois des variétés Bourbon (B) et Bourbon pointu (BP) s'étant développés à la Réunion (RUN) ou) Montpellier (MPL). Les positions d'entre-nœud varient de 1 (premier entre-nœud au dessus des feuilles cotylédonaires) à 4 (avant-dernier entre-nœud). Le cinquième et dernier entre-nœud est à part puisque venant d'être émis il n'a pas encore fini sa croissance.

III.3.1.2 Treize mois plus tard (plants âgés de 18 mois)

Les analyses sur la hauteur des plantes confirment les résultats obtenus à cinq mois. Le Bourbon pointu est toujours plus petit (Tableau II.6), atteignant environ 59% de la taille du Bourbon. Malheureusement, le nombre d'entre-nœuds n'a pu être estimé, la lignification ayant effacé les traces des plus anciens entre-nœuds.

Deux entre-nœuds ont été choisis par rapport à leur stade de développement : l'entre-nœud K-2 en fin de sa croissance et l'entre-nœud K en pleine croissance. Pour les deux, la longueur est plus importante chez le Bourbon (Tableau II.6) mais la différence relative est malgré tout la plus forte pour l'entre-nœud K-2 en fin de croissance.

En résumé, la longueur de l'entre-nœud est toujours un facteur important pour expliquer la différence de taille. Une analyse histologique est maintenant nécessaire pour comprendre son origine au niveau cellulaire (part de la mère et de l'auxèse).

III.3.2 Taille et forme des cellules à l'origine des différences de longueur d'entre-nœud.

Parmi toutes les mesures, la hauteur de la cellule contribue le plus à la différence de longueur de l'entre-nœud. En fait, les différences entre BP et B évoluent selon l'emplacement de la cellule (E1 à E4), comme le montre l'interaction « mutation-emplacement » (Tableau II.7) : si la hauteur des cellules (Cell_Ht) ne change pas de E1 à E4 chez BP, elle double chez le Bourbon. Dans ce dernier cas, elle explique en partie la croissance en longueur de l'entre-nœud (Tableau II.6). Enfin, le rapport BP/B diminue de E1 à E4 (Tableau II.5), c.a.d. lorsque la distance à l'apex augmente. Il tend asymptotiquement vers 64 % pour l'entre-nœud K-3 et les suivants.

La largeur des cellules (Cell_Larg) et l'indice de forme (Cell_Form) n'expliquent pas directement la différence de longueur liée à la mutation. Néanmoins, leur analyse permet de mieux comprendre les modifications induites par cette dernière dans les processus de croissance.

La largeur de la cellule est toujours plus petite dans les entre-nœuds du Bourbon pointu (Tableau II.8), le rapport des largeurs BP/B étant relativement constant quel que soit l'emplacement de la coupe (64% en moyenne).

Tableau II.6 : Résultat de l'ANOVA à un facteur sur la taille des plants (Pl_H) et les longueurs d'entre-noeud (K_L et K-2_L) chez Bourbon (B) et Bourbon pointu (BP) âgés de 18 mois. Tous les caractères montrent des différences significatives.

	BP	B	F _{1, 22}	p
Pl_H	284	477	32.8	< 0,00001
K_L	5	25	19.6	0,0002
K-2_L	14	39	43.0	< 0,00001

Tableau II.7 : Résultats des ANOVA à deux facteurs concernant la hauteur des cellules (Cell_Ht), leur largeur (Cell_larg) et l'indice de forme cellulaire (Cell_form) chez le Bourbon et le Bourbon pointu. Les effets significatifs sont en gras.

	Inter-variété		Inter-emplacement		Interaction	
	F _{1, 88}	p	F _{3, 88}	p	F _{3, 88}	P
Cell_Ht	5,76	0,018	34,5	< 0,00001	17,1	< 0,00001
Cell_Larg	293	< 0,00001	4,28	0,007	1,61	0,19
Cell_Form	83.7	< 0,00001	11,4	< 0,00001	4,60	0,005

Tableau II.8 : Caractéristiques cellulaires chez le Bourbon et le Bourbon pointu à quatre emplacements de l'axe orthotrope. Les lettres en exposant indiquent le résultat du test de comparaison multiple de moyenne HSD de Tukey.

	Bourbon pointu	Bourbon	Rapport (%)
Cell_larg (µm)			
E1	36,1 ^a	53,4 ^c	67,6
E2	39,1 ^b	62,2 ^d	62,9
E3	38,2 ^b	60,4 ^d	63,2
E4	39,0 ^b	61,8 ^d	63,1
Cell_Ht (µm)			
E1	36,9 ^{ab}	28,7 ^a	128,6
E2	38,6 ^b	34,9 ^{ab}	110,6
E3	41,8 ^{bc}	48,9 ^c	85,5
E4	41,0 ^b	57,6 ^d	71,2
Cell_Form			
E1	0,99 ^{bc}	0,54 ^a	183,3
E2	1,01 ^{bc}	0,56 ^a	180,4
E3	1,07 ^c	0,82 ^b	130,5
E4	1,11 ^c	0,95 ^{bc}	116,8

L'analyse de l'indice de forme confirme les observations ci-dessus (Tableaux II.7 et II.8). Chez le Bourbon pointu, la forme des cellules ne varie pas de E1 à E4 avec un l'indice proche de 1,05 en moyenne (les cellules ont quasiment une forme cubique). Chez le Bourbon, les cellules sont d'abord rectangulaires en E1 et E2 et deviennent quasiment cubiques en E4 (Figures II.10 et II.11).

En résumé, chez le Bourbon pointu, la forme des cellules est fixée dès la position E1, même si une augmentation de taille des cellules, en hauteur et largeur, a lieu de l'entre-nœud K à K-2. A l'opposé, chez le Bourbon, les cellules, rectangulaires en E1, grandissent sans changer de forme de E1 à E2, puis voient leur hauteur s'accroître sans modification de largeur, pour devenir presque cubiques en E4 (Figure II.11). Par conséquent, le rapport BP/B calculé pour d'indice de forme cellulaire converge vers 1 (absence de différence, lorsque la distance à l'apex augmente).

III.3.3 Nombre de cellules à l'origine des différences de longueur d'entre-noeuds.

Le nombre de cellules en hauteur est la seconde caractéristique pouvant expliquer la différence de longueur de l'entre-nœud. Effectivement, $Ht_K_Cell_N$ est six fois plus petit chez le Bourbon pointu que chez le Bourbon (Tableau II.9). Le principal effet de la mutation concerne bien le processus de division cellulaire : Chez le Bourbon, le nombre de cellules déterminant la longueur l'entre-nœud est défini dès le premier entre-nœud, alors qu'il double entre l'entre-nœud K et K-2 chez Bourbon pointu.

Les cellules présentes dans le diamètre médullaire d'un entre-nœud sont elles aussi moins nombreuses chez le Bourbon pointu (Tableau II.9), quel que soit l'âge de l'entre-nœud. Cette dernière conclusion est aussi valable pour le Bourbon. Le rapport BP/B est de 64%, constante souvent évoquée jusqu'à maintenant. Ainsi, la division cellulaire dans le sens de la largeur s'arrête précocement fixant ainsi le nombre de cellules.

En résumé, le Bourbon pointu et le Bourbon se sont différenciés sur deux points : 1) les cellules sont plus petites chez le Bourbon pointu, 2) chez le Bourbon, la croissance de la tige peut être attribuée à la division cellulaire (mère) du dernier entre-nœud émis, puis à l'élongation cellulaire (cinétique classique de croissance). Chez le Bourbon pointu, la croissance est due à la mère seulement (presque pas d'auxèse) et dans les deux derniers entre-nœuds.

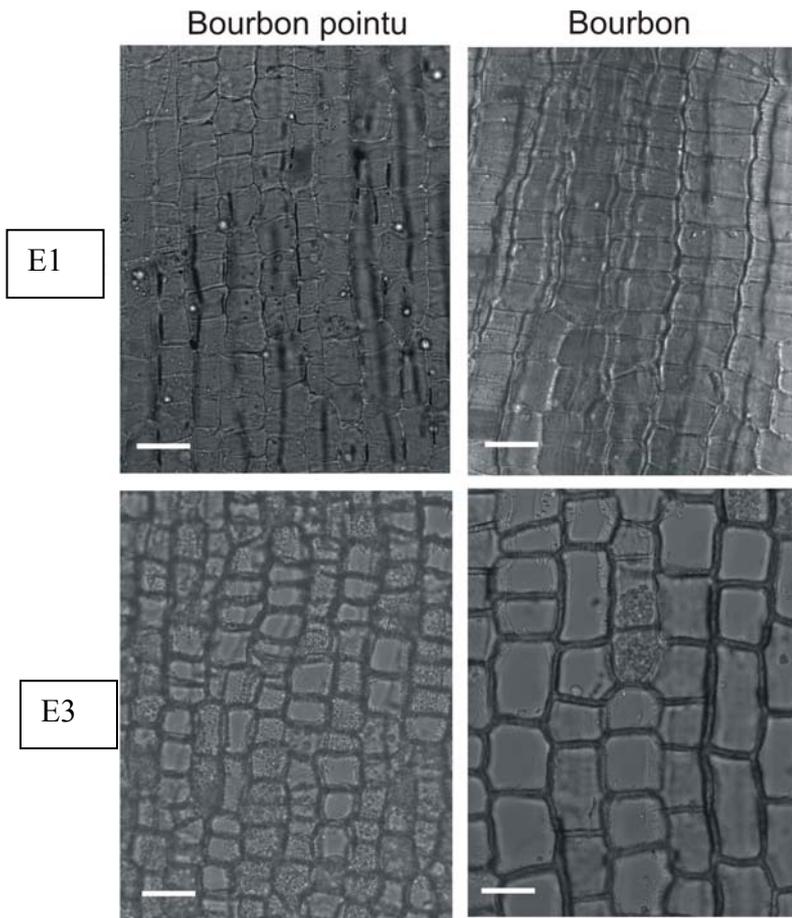


Figure II.10 : Forme cellulaire dans la moelle aux emplacements E1 et E3 le long de l'axe orthotrope chez les variétés Bourbon et Bourbon pointu. Une barre représente 100µm.

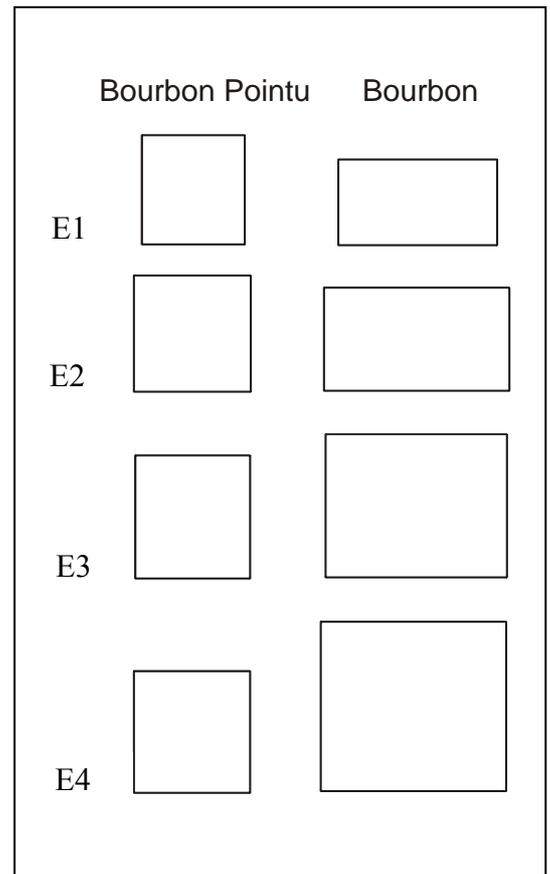


Figure II.3 : Variations de taille et de forme des cellules de la moelle à quatre emplacements (E1, E2, E3, E4) chez les deux variétés Bourbon et Bourbon pointu.

	BP	B	Entre B et BP	
			F _{1, 22}	P
Dm _K Cell N	24	41	23,8	0,00007
Dm _{K-2} Cell N	25	36	28,8	0,00002
EN _K Cell N	151	900	22,5	0,0001
EN _{K-2} Cell N	338	832	36,5	<0,00001

Tableau II.9 : Résultats des ANOVA à un facteur concernant le nombre de cellules en largeur et en hauteur dans le moelle des emplacement E1 et E3 chez les variétés Bourbon et Bourbon pointu. Toutes les analyses montrent des différences significatives.

III.3.4 *Fréquence relative de mères et d'auxèses dans L1, L2, L3 et L4 chez Bourbon*

Quelque soit la zone, les valeurs de hauteurs de cellules sont en fait une moyenne entre celles en division et celles en phase d'élongation. Au contraire, $Dm_K_Cell_N$, fixé depuis L1, permet une estimation grossière de la hauteur des cellules en division (24,9 μm) à partir de $Cell_Larg$. En se basant sur cette estimation, la fréquence de la mérisis serait en L1, L2, L3 et L4, respectivement de 90 %, 73 %, 34 % et 11%.

III.4 *Impact de la mutation sur le port de l'arbre*

III.4.1 *Origine macroscopique des variations de port chez les arbres adultes*

L'angle entre l'axe orthotrope et les axes plagiotropes peut induire un changement de forme. Néanmoins, ce caractère ne permet pas de différencier le Bourbon du Bourbon pointu ($F_{1,8} = 4,43$; $p = 0,069$). Les mesures aboutissent à une estimation commune de 50°. En revanche, les angles de ramification ne sont pas identiques d'un plant à l'autre à l'intérieur soit du Bourbon, soit du Bourbon pointu ($F_{8,30} = 3,33$; $p = 0,0077$), bien que l'amplitude de la variation n'ait été dans les deux cas que de 3°. Par conséquent, l'angle de ramification ne peut expliquer les différences morphologiques entre Bourbon et Bourbon pointu.

La forme de l'arbre dépend aussi théoriquement de la croissance relative des axes plagiotropes par rapport à l'axe orthotrope. Cette croissance relative s'exprime quantitativement dans le ratio R_i (longueur moyenne des deux axes plagiotropes situés à la base de l'entre-nœud « i »/longueur de l'axe orthotrope de son sommet à la base de l'entre-nœud « i »). Ce ratio est différent entre le Bourbon et le Bourbon pointu ($F_{1,32} = 59,2$; $p = 0,00024$) et diminue de R1 à R4 ($F_{1,32} = 59,2$; $p = 0,00024$). Il s'étend de 0,80 à 0,59 chez le Bourbon pointu et de 1,21 à 0,85 chez le Bourbon. D'après l'absence d'interaction, la décroissance relative du ratio de R1 à R4 est similaire chez le sauvage et le muté ($F_{3,32} = 0,64$; $p = 0,59$).

Surtout, cette évolution du ratio de R1 à R4 n'est pas linéaire. Pour le Bourbon comme pour le Bourbon pointu, la relation entre le rapport R_i et la variable « i » a pu être ajustée à une exponentielle $y = a \cdot \exp(b \cdot X) + c$ avec $b < 0$ (Figure II.12). Le paramètre « c » représente l'asymptote, c.a.d. la valeur R_i lorsque « i » tend vers l'infini. Ce paramètre vaut 0,58 et 0,81 respectivement pour le Bourbon et le Bourbon pointu. Enfin, cette asymptote est quasiment atteinte dès le quatrième entre-nœud, c.a.d. au moment de la lignification.

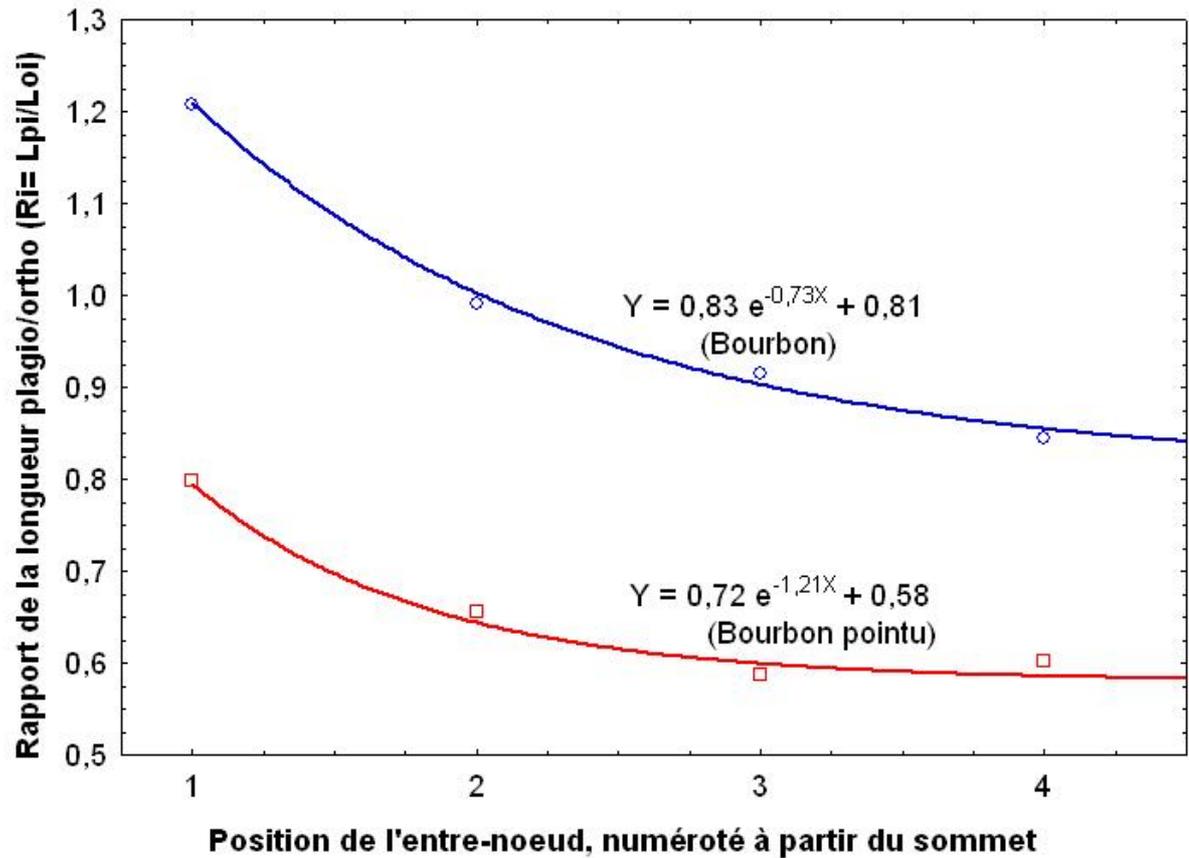


Figure II.12 : Relation entre le rapport Ri (rapport de la longueur plagio/ortho) et la variable « i » indiquant l'ordre d'insertion des axes plagiotropes le long de l'axe orthotrope. Les entre-nœuds ont été numérotés à partir du sommet de l'arbre.

La variation du ratio selon une exponentielle peut expliquer la différence de forme entre variété chez les arbres adultes. Plus « i » augmente, moins la part des entre-nœuds jeunes non lignifiés est importante par rapport aux entre-nœuds lignifiés. L'effet de la mutation concerne ainsi la croissance relative des plus jeunes entre-nœuds des axes plagiotropes et de l'axe orthotrope (Figure II.13).

Un ratio R_i indépendant de « i » correspondrait à une forme purement conique. Il est donc possible de calculer l'angle β d'ouverture du cône dans lequel s'inscrit B et BP une fois le quatrième entre-nœud atteint. Cet angle est beaucoup plus aigu chez BP (35° vs 52°).

Les résultats obtenus précédemment lors de la comparaison des longueurs d'entre-nœud de l'axe orthotrope chez BP et B sont confirmés ici. En effet, chez le Bourbon, l'entre-nœud atteint sa taille finale (9,3 cm environ), dès qu'il se retrouve en position K-2. Pour le Bourbon pointu au contraire, la longueur est quasiment fixée dès le premier entre-nœud (4,1 cm en moyenne). Ce comportement particulier du Bourbon pointu n'est pas observé sur les axes plagiotropes. Pour chacune des deux variétés, l'entre-nœud d'un plagiotrope finit sa croissance lorsqu'il se situe en position K-2 sur l'axe.

La longueur de l'entre-nœud K a aussi été mesurée sur les plagiotropes P1 à P4 chez les deux variétés. Elle ne montre aucune différence entre les plagiotropes P₂, P₃ et P₄ avec respectivement 1,6 et 4,3 cm en moyenne chez le Bourbon pointu et Bourbon. Chez le plagiotrope P1, l'entre-nœud K (en fait l'unique entre-nœud de l'axe) est nettement plus grand avec 3,3 et 5,9 respectivement chez Bourbon pointu et Bourbon. De tels résultats ont conduit à étudier la hauteur cellulaire dans l'entre-nœud K de l'axe orthotrope et des plagiotropes P1 et P3.

III.4.2 Origine cellulaire des différences de port chez les arbres adultes

La différence de port des arbres entre BP et B semble dépendre de la croissance relative de l'entre-nœud entre les plagiotropes (P) et l'axe orthotrope (O), mais aussi entre les axes plagiotropes eux-mêmes (P1, P2, etc....). En conséquence, des coupes histologiques ont été réalisées au centre du dernier entre-nœud formé et visible de O, P1 et P3. Seule la hauteur cellulaire a été estimée à partir de la moelle de ces entre-nœuds.

Aucune différence de hauteur n'a été observée entre O, P1 et P3 ($F_{2,24} = 1,18$; $p = 0,32$) et ceci est valable pour les deux variétés (absence d'interaction : $F_{2,24} = 0,18$; $p = 0,83$). En revanche, la hauteur plus importante des cellules du Bourbon a été confirmée

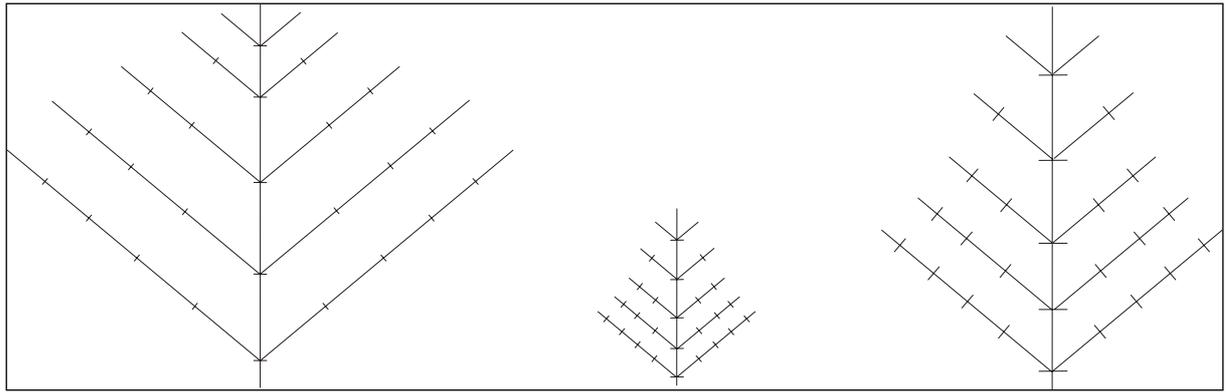


Figure II.13 : Représentation (à l'échelle) des cinq derniers entre-noeuds du Bourbon et du Bourbon pointu.

Premier sur la gauche : Partie supérieure du Bourbon

Au centre : Partie supérieure du Bourbon pointu

Premier sur la droite : Partie supérieure du Bourbon pointu agrandie de telle façon que l'axe orthotrope mesure la même longueur que celui du Bourbon

III.3 Mise en évidence et origine des différences induites par la mutation concernant la taille de la plante.

III.3.1 Comparaison entre Bourbon et Bourbon pointu à un stade juvénile

III.3.1.1 Jeunes plants âgés de cinq mois

A cinq mois, les jeunes plants de Bourbon, mesurés depuis les feuilles cotylédonaire jusqu'au sommet, sont deux fois et demi plus grands que les Bourbon pointu, à la fois à Montpellier et à la Réunion (Tableau II.5). Bien que leur hauteur soit plus élevée en moyenne à la Réunion, la différence relative est constante dans les deux zones (absence d'interaction). La différence de hauteur peut avoir comme origine soit le nombre d'entre-nœuds, soit leur taille ou encore les deux.

Les entre-nœuds sont moins nombreux (-13,7%) chez le Bourbon pointu dans les deux environnements ($F_{1,36} = 13,0$; $p = 0.00094$). Néanmoins, cette différence ne peut expliquer toute la différence de taille. En revanche, les entre-nœuds sont bien plus nombreux dans l'ombrière de la Réunion que dans la serre de Montpellier ($F_{1,36} = 84$; $p < 0,000001$). Dans ces conditions, le caractère peut expliquer en partie, la différence de croissance entre les deux environnements. Notons aussi l'absence d'interaction « mutation-environnement » ($F_{1,36} = 1.92$; $p = 0.17$) pour le caractère.

Les variations de longueur ont été analysées pour les cinq entre-nœuds présents au dessus des feuilles cotylédonaire (Tableau II.5 et Figure II.9). Quatre principaux résultats sont relevés :

- 1) La longueur du premier entre-nœud pris à partir du sommet ne varie pas ni entre BP et B, ni entre environnements ;
- 2) En revanche ; pour les quatre autres entre-nœuds, elles sont en moyenne plus grandes chez le Bourbon ;
- 3) Pour le Bourbon pointu, la longueur diminue du premier entre-nœud au cinquième à Montpellier, alors qu'elle est relativement constante à la Réunion ;
- 4) Pour le Bourbon, elle augmente nettement après le second entre-nœud pour atteindre un maximum à l'entre-nœud 4. Par conséquent, la plus grande différence liée à la mutation touche le quatrième entre-nœud lignifié.

En résumé, chez les plantes âgées de cinq mois, la plus grande taille du Bourbon est due à des entre-noeuds plus grands.

($F_{1,24} = 7.79$; $p = 0,010$). Par conséquent, la différence de taille d'entre-nœuds entre O, P1 et P3 ne peut être expliquée que par une variation du nombre de cellules.

III.5 Action de la gibbérelline exogène

L'objectif de cette expérience a été de tester les réactions du Bourbon pointu par rapport au Bourbon à la suite d'un apport de gibbérellines exogènes.

III.5.1 Au début du traitement (T0)

Comme attendu, aucun effet traitement, ni d'interaction (Tableau II.10) n'ont été observés au temps T0. L'absence de différences entre B et BP pour le nombre d'entre-nœuds a aussi été vérifiée (7,89 en moyenne) (Tableau II.10). En revanche, la longueur des entre-nœuds K-2 à K est toujours plus grande chez le Bourbon (Tableau II.11).

III.5.2 A la fin du traitement (T1)

III.5.2.1 Croissance des entre-nœuds déjà présents au temps T0

La différence entre B et BP sur l'élongation de l'entre-nœud entre T0 et T1 n'existe que pour le dernier entre-nœud K présent à T0. Ainsi, cette différence variétale s'exprime principalement au début de la croissance de l'entre-nœud (Tableau II.12). De même, l'effet de la gibbérelline n'est actif que sur la croissance de cet entre-nœud K.

Surtout, la gibbérelline agit différemment sur cette croissance selon B ou BP (Tableau II.12). Chez les plants témoins, la croissance de l'entre-nœud K est de 1,21 cm chez le Bourbon et de 0,74 cm chez le Bourbon pointu et le rapport BP/B est égal à 0,61. Avec traitement, l'augmentation de taille est de 5,30 et 1,29 cm respectivement chez le Bourbon et le Bourbon pointu. Ici, le ratio variétal tombe à 0,24. Le dernier entre-nœud K présent au temps T0 est plus sensible à la gibbérelline chez la variété Bourbon.

III.5.2.2 Nombre de nouveaux entre-nœuds (plastochrone)

Le plastochrone reste identique entre B et BP et n'est pas modifié par le traitement à la gibbérelline entre T0 et T1 (Tableau II.12). En moyenne, il y a eu 0,96 entre-nœuds apparus en 17 jours.

Tableau II.10 : Analyse de la variance d'un modèle équilibré à deux facteurs fixes avec interaction : variété et traitement.

	Effet Variété	Effet traitement	Interaction
Nombre d'entre-nœuds	$F_{1,24} = 1,55$; $p = 0,23$	$F_{1,24} = 0,79$; $p = 0,38$	$F_{1,24} = 2,89$; $p = 0,12$
Longueur K-2	$F_{1,24} = 93,6$; $p < 0,000001$	$F_{1,24} = 3,26$; $p = 0,08$	$F_{1,24} = 0,79$; $p = 0,38$
Longueur K-1	$F_{1,24} = 107$; $p < 0,000001$	$F_{1,24} = 2,39$; $p = 0,14$	$F_{1,24} = 2,15$; $p = 0,16$
Longueur K	$F_{1,24} = 42,4$; $p < 0,000001$	$F_{1,24} = 2,54$; $p = 0,12$	$F_{1,24} = 1,97$; $p = 0,17$
Longueur totale	$F_{1,24} = 129$; $p < 0,000001$	$F_{1,24} = 0,49$; $p = 0,49$	$F_{1,24} = 0,15$; $p = 0,70$

Tableau II.11 : Moyennes des longueurs d'entre-nœuds observées chez les deux variétés au temps T0

	Bourbon	Bourbon pointu
L K-2	6,04	1,52
L K-1	6,98	1,43
L K	4,07	0,62
LT	17,1	3,59

Tableau II.12 : Analyse de la variance d'un modèle équilibré à deux facteurs fixes avec interaction : variété et traitement.

	Effet Variété	Effet traitement	Interaction
Croissance K-2	$F_{1,24} = 2,69$; $p = 0,11$	$F_{1,24} = 1,09$; $p = 0,31$	$F_{1,24} = 0,20$; $p = 0,66$
Croissance K-1	$F_{1,24} = 0,26$; $p = 0,61$	$F_{1,24} = 2,76$; $p = 0,11$	$F_{1,24} = 0,15$; $p = 0,71$
Croissance K	$F_{1,24} = 15,0$; $p = 0,0007$	$F_{1,24} = 16,0$; $p = 0,0005$	$F_{1,24} = 9,34$; $p = 0,0005$
Nombre de nouveaux entre-nœuds	$F_{1,24} = 0,13$; $p = 0,72$	$F_{1,24} = 0,13$; $p = 0,72$	$F_{1,24} = 1,17$; $p = 0,29$

III.5.3 *Un mois après la fin du traitement (T2)*

La mort de deux plants a conduit à un modèle d'ANOVA déséquilibré, mais toujours à deux critères de classification.

III.5.3.1 Longueur moyenne des nouveaux entre-nœuds apparus

La gibbérelline agit sur la longueur moyenne des nouveaux entre-nœuds apparus (Tableau II.13), cet effet étant similaire chez B et BP ($\times 2,06$).

III.5.3.2 Nombre de nouveaux entre-nœuds (plastochrone)

Au temps T2, le plastochrone est identique pour les deux variétés non traitées (Tableau II.13). En revanche, le nombre de nouveaux entre-nœuds apparus depuis T0 a doublé en présence de gibbérelline chez le Bourbon (3,83), alors qu'il est resté inchangé chez le Bourbon pointu.

En résumé, la modification du plastochrone est plus tardive que celle de l'élongation. Globalement, la gibbérelline double la longueur et le nombre des entre-nœuds nouvellement apparus chez le Bourbon, et seulement la longueur chez le Bourbon pointu. La croissance totale entre T0 et T2 est ainsi quatre fois plus importante chez le Bourbon que chez le Bourbon pointu.

III.5.4 *Action sur la forme des feuilles*

III.5.4.1 Comparaison entre Bourbon et Bourbon pointu non traités

Les différences de dimensions foliaires, visibles de manière évidente, sont confirmées statistiquement, pour la longueur ($F_{1,46} = 102$; $p < 10^{-6}$) et la largeur ($F_{1,46} = 104$; $p < 10^{-6}$). Le ratio BP/B est d'environ 0,51 pour les deux caractères. En d'autres termes, la feuille est dimensionnellement deux fois plus petite chez le Bourbon pointu, soit quatre fois plus petite en surface.

En revanche, la forme de la feuille reste inchangée ($F_{1,46} = 1,69$; $p = 0,20$) avec un indice de forme de 2,5 en moyenne pour B et BP.

III.5.4.2 Chez le Bourbon

L'effet de la gibbérelline concerne la longueur de la feuille ($F_{1,50} = 18,9$; $p = 0,00007$), sa largeur ($F_{1,50} = 86,3$; $p < 10^{-6}$) et sa forme ($F_{1,50} = 26,6$; $p = 0,000004$)

Tableau II.13 : Analyse de la variance d'un modèle déséquilibré à deux facteurs fixes avec interaction : variété et traitement

	Effet Variété	Effet traitement	Interaction
Nombre de nouveaux entre-noeuds	$F_{1,22} = 1,14 ; p = 0,30$	$F_{1,22} = 9,82 ; p = 0,005$	$F_{1,22} = 9,07 ; p = 0,006$
Longueur moyenne des nouveaux entre-noeuds	$F_{1,22} = 40,7 ; p = 0,000002$	$F_{1,22} = 22,7 ; p = 0,00009$	$F_{1,22} = 3,79 ; p = 0,06$

Chez le témoin, la feuille a, en moyenne sur nos plants, une longueur de 15,5 cm et une largeur de 6,4 cm. Ceci donne un indice de forme de 2,4. Sur les feuilles apparues après traitement, il est constaté une diminution de la longueur de 27%, mais surtout de la largeur de 57%. Ceci conduit à des feuilles plus fines dont l'indice de forme de 4,9 est le double de celui observé chez le témoin.

III.5.4.3 Chez le Bourbon pointu

De nouveau la gibbérelline agit à la fois sur la longueur de la feuille ($F_{1,48} = 5,66$; $p = 0,021$, sur sa largeur ($F_{1,48} = 39,0$; $p < 0,000001$) et sa forme ($F_{1,48} = 43,1$; $p < 0,000001$).

Chez le témoin, la feuille a, en moyenne, une longueur de 8 cm et une largeur de 3,2 cm. L'indice de forme est alors de 2,5. Après traitement, il y a bien diminution de la longueur comme chez Bourbon, et du même ordre de grandeur (22%). De nouveau, c'est la largeur qui est la plus affectée (53%). Ceci résulte en des feuilles plus fines avec un indice de forme de 4,8 proche de celui observé chez le témoin.

IV Discussion et perspectives

IV.1 Effets de la mutation Laurina sur l'apex caulinaire

Cette discussion des résultats obtenus concerne principalement deux aspects. Le premier a pour objectif le fonctionnement du méristème chez le caféier dont cette étude est la première description à ce jour. Le second est focalisé sur l'action de la mutation Laurina sur les dimensions, la structure et le fonctionnement de l'apex caulinaire. Un troisième aspect moins important concerne la variation du plastochrone entre Bourbon pointu et Bourbon dans certaines conditions de milieu.

IV.1.1 Description de la structure et du fonctionnement de l'apex et du Méristème Apical Caulinaire chez le Bourbon

Le méristème apical caulinaire du Bourbon émet régulièrement et invariablement des feuilles, stipules et entre-nœuds dans nos conditions environnementales. En effet, l'apex contient toujours le même nombre d'organes en formation. De plus, le cycle de fonctionnement interne étant lié au cycle de fonctionnement macroscopique, le phyllochrone constitue une estimation du plastochrone. Par conséquent, le terme « plastochrone » sera utilisé dans la suite du document à la place du terme « phyllochrone ».

Les variations de forme et de taille du méristème apical caulinaire durant le plastochrone sont bien décrites chez les plantes à feuilles alternes (Buvat, 1952; 1955; 1989; Lance, 1957; Nougarede, 1967). Le développement de l'initium foliaire primordium a lieu au dépens de la surface du méristème. Celui-ci passe ainsi par une aire réduite : c'est l'aire minimale. Plus ou moins rapidement selon les espèces, sa régénération se réalise à partir de l'aisselle du dernier primordium formé. Simultanément, la taille du méristème s'accroît horizontalement vers le lieu de la prochaine initiation foliaire que le trajet des hélices foliaires permet de prévoir (Plantefol, 1948). Au cours du plastochrone, des changements de forme et de volume des zones ont lieu dont il convient de tenir compte dans tout modèle proposé pour le fonctionnement du méristème. Ces événements, répétés à chaque plastochrone, permettent, entre autres, au méristème de conserver ses dimensions malgré l'initiation foliaire.

Chez *C. arabica*, plante à feuilles opposées-décussées, des variations de taille et de forme ont aussi été observées durant un plastochrone. Ce dernier a été décomposé en quatre phases successives : méristème en forme de dôme (phase « dôme »), de forme trapézoïdale (phase « trapèze »), avec de petites ébauches foliaires (phase « petites ébauches ») ou avec de grandes ébauches foliaires (phase « grandes ébauches »). Le diamètre minimal du méristème a été enregistré durant la phase « trapèze » (94µm), tandis que sa taille maximal apparaît en phase « dôme » (262µm). Ainsi, chez le Bourbon, les variations itératives de forme et de taille du méristème semblent bien avoir lieu (tout comme pour les axes à feuilles alternes).

IV.1.2 *Effet de la mutation Laurina sur l'apex et la taille du méristème apical caulinaire*

Les deux principales caractéristiques de l'effet de la mutation Laurina sur l'apex sont sa précocité d'action sur le plastochrone et sa localisation juste en dessous du méristème et des primordiums. Parmi tous les caractères mesurés, le plus petit ratio BP/B (0,45) concerne la hauteur H2 pendant la phase « trapèze » (Tableau II.2). En fait, la hauteur H2 peut être interprétée comme la longueur du nouvel entre-nœud en formation. Durant la phase « trapèze », la distance H1, qui mesure la hauteur de la future ébauche foliaire, a aussi montré de grosses modifications (BP/B = 0,68). A l'opposé, les effets les moins importants concernent les diamètres D1, D2, et la largeur du primordium D3. Durant la phase « trapèze », des modifications du taux et de l'orientation des divisions donnent naissance aux cellules fondatrices des primordiums dans la zone périphérique (Laufs *et al.*, 1998a, b). De plus la formation du primordium débute avec une augmentation de la fréquence des divisions

périclines (parallèles à la surface du méristème) dans les assises supérieures, comme cela a été observé chez *Pisum sativum* (Cunninghame et Lyndon, 1986; Lyndon et Cunninghame, 1986), tandis que dans les assises profondes, des expansions cellulaires ont lieu dans l'axe de la future feuille (Green, 1985).

L'impact de la mutation Laurina sur les nouveaux entre-nœuds se poursuit dans la phase « petites ébauches », mais d'une façon moins évidente (BP/B = 0,57). Le principal effet concerne alors la hauteur H1 des nouvelles ébauches foliaires, avec leurs propres méristèmes. Leur développement est devenu indépendant de celui du méristème apical. Pendant cette phase, les diamètres D1 et D2, ainsi que la largeur D3 du primordium, sont devenus plus contrastés entre BP et B. Cette tendance se poursuit d'ailleurs jusqu'à la fin de la croissance des feuilles et de l'entre-nœud. Pendant la croissance foliaire, la régénération du méristème apical mène à la phase « dôme », celle-ci ne montrant alors plus de différence entre B et BP. Une telle boucle permet de maintenir un effet constant de la mutation le long des générations de phytomères.

Deux groupes de gènes pourraient avoir une implication dans la différence de taille du méristème apical. Le premier inclut les gènes *WUSCHEL* (*Wus*) et *CLAVATA* (*Clv*). Ils jouent un rôle dans la maintenance des cellules fondatrices du méristème apical. Le second groupe, constitué par le facteur de transcription *ANTEGUMENTA* (*Ant*), agit dans les divisions cellulaires donnant naissance à la future feuille.

Une boucle de régulation négative entre *Wus* et trois gènes *Clv* évite les fluctuations de taille du méristème apical durant le développement (Weigel et Jurgens, 2002). *Wus* code un facteur de transcription à homéodomaine. Celui-ci s'exprime dans un petit groupe de cellules centrales, situées juste à deux ou trois couches cellulaires en dessous de la tunica et régit la destinée cellulaire des cellules avoisinantes (Mayer *et al.*, 1998; Schoof *et al.*, 2000). Les produits des gènes *Clv* forment un complexe régulant négativement le gène *Wus*. C'est l'équilibre entre les effets de *Wus* et *Clv* qui maintient constante la taille du méristème apical. La boucle de régulation *Wus-Clv* pourrait être modifiée entre B et BP.

Le facteur de transcription *Ant* est aussi un gène candidat intéressant. En effet, il joue un rôle dans le contrôle du nombre de cellules et dans la taille des organes lors de leur développement. Il assure l'accroissement tout en maintenant la compétence méristématique. De ce fait, la croissance se poursuit tant qu'il fonctionne dans l'organe en développement (Mizukami et Fisher, 2000). Ce facteur de transcription maintient la capacité des cellules à croître et à se diviser de manière coordonnée pendant l'organogenèse. Son activité est à la fois

nécessaire et suffisante pour contrôler la taille des organes et le nombre de cellules dans tous les primordiums d'*Arabidopsis thaliana* (Mizukami et Fisher, 2000). La perte de son activité dans les plantes mutées *ant-1* réduit la taille de tous les organes latéraux en diminuant le nombre de cellules. La largeur et la longueur des feuilles matures *ant-1* sont toutes les deux réduites, mais le plastochrone n'est pas modifié entre le mutant et la plante sauvage. Cette mutation a donc de grandes similarités avec la mutation Laurina.

IV.1.3 *Le cas particulier du plastochrone*

La plupart des mutants présentant un changement de taille de leur méristème apical caulinaire ont à la fois une phyllotaxie et une durée de plastochrone modifiées. A ce jour, seuls un petit nombre présentent un changement de plastochrone sans effets sur la phyllotaxie. C'est le cas du mutant Plastochron-1 (*pla1*) du riz. Son plus grand méristème apical est associé à un plastochrone plus rapide (Itoh *et al*, 1998 ; Miyoshi *et al*, 2004). Dans le cas de la mutation Laurina, il n'y a aucun effet sur la phyllotaxie et l'impact sur le plastochrone doit être discuté.

Le plastochrone de BP ne change pas entre l'ombrière à Saint Pierre et la serre tropicale de Montpellier. Comme le plastochrone est connu pour être influencé par le milieu, ceci implique des conditions de croissance similaires dans les deux cas. Mais dans ce cas comment expliquer la différence de plastochrone observée pour le Bourbon entre ces deux environnements ? En fait, ceci pourrait être une conséquence indirecte de la mutation. Si le Bourbon pointu est bien connu pour être mieux adapté à la sécheresse que le Bourbon, il est inversement plus sensible à des taux d'humidité du sol plus important (M. Noirot, communication personnelle). Le taux élevé et constant d'humidité dans la serre de Montpellier pourrait avoir eu un effet positif sur le Bourbon, mais négatif sur le Bourbon pointu.

Le dernier résultat important concerne l'absence de différence de taille entre les deux environnements. Ceci implique une liaison négative entre le plastochrone et la longueur d'entre-nœud : plus les entre-nœuds sont nombreux, moins ils sont grands. Il est néanmoins évident que ce résultat, obtenu dans des conditions de température presque similaires, doit être vérifié dans des environnements beaucoup plus contrastés.

IV.1.4 Conclusions

La mutation Laurina semble agir très précocement sur le méristème foliaire et les cellules souches du jeune entre-nœud. Chez le mutant, les primordiums et les ébauches foliaires sont plus petits, ce qui conduira après croissance à de plus petites feuilles et de plus petits entre-nœuds. De ce point de vue, la plus petite taille générale de l'apex caulinaire chez le Bourbon pointu résulte de la présence de ces plus petits primordiums. Ce diamètre plus petit de l'apex concerne uniquement l'axe qui passe par les deux primordiums. Il n'y a pas de différence de taille pour le méristème dans sa phase « dôme », orienté alors selon un axe perpendiculaire, mais toujours horizontal, au précédent.

Deux perspectives indépendantes peuvent être proposées. La première est d'étudier les conséquences de la mutation Laurina sur la croissance et la taille de l'entre-nœud. La seconde est de tester les hypothèses concernant *Wu* et *Clv* d'un côté, et *Ant* de l'autre côté.

IV.2 *Effet de la mutation sur l'élongation et la division cellulaire avec les conséquences induites sur la taille des entre-nœuds*

La discussion comprend deux parties. La première concerne l'effet de la mutation Laurina sur le nanisme au travers de son action sur la division et l'élongation cellulaire. A l'intérieur de cette partie, les mécanismes de croissance des entre-nœuds du Bourbon sont comparés à ceux d'autres dicotylédones ligneuses. Il sera ensuite discuté des modifications induites par la mutation sur la croissance diamétrale et en longueur de l'entre-nœud chez le Bourbon pointu. Les similitudes avec les conséquences du stress hydrique chez *Helianthus annuus* seront aussi évoquées.

Dans la seconde partie, les perspectives de recherche évoquées sont basées sur les hypothèses hormonales pouvant expliquer les effets de la mutation sur la longueur des entre-nœuds.

IV.2.1 *La mutation Laurina affecte à la fois l'élongation (l'auxèse) et la division (mèrese) cellulaire dans la tige et mime un effet de stress hydrique*

La croissance d'un entre-nœud peut être la conséquence d'élongation et/et de division cellulaire. La croissance des entre-nœuds commence à être bien documenté chez certaines dicotylédones ligneuses. Néanmoins, les résultats présentés sont les premiers dans le genre *Coffea*.

IV.2.1.1 Les entre-nœuds du Bourbon ont une croissance typique d'autres dicotylédones ligneuses

Une des premières études sur la croissance de l'entre-nœud prenant en compte le nombre et la taille des cellules a concerné *Helianthus annuus* L. (Garrison, 1973). L'élongation et la division cellulaire ne sont pas limitées à des zones spécifiques ou à une phase particulière comme c'est le cas chez les monocotylédones, ou elles sont localisées dans les méristèmes intercalaires (Fisher et French, 1976). Chez les dicotylédones, une relation existe entre la mèresè et l'auxèse tout le long du développement de l'entre-nœud. Dans les plus jeunes entre-nœuds du tournesol, la mèresè est maximale, tandis que l'auxèse est minimal. Par la suite, la fréquence de la mèresè diminue tandis que celle de l'auxèse augmente jusqu'à la fin de la croissance.

Le profil de l'élongation de l'entre-nœud et l'histogénèse du Bourbon est qualitativement similaire que ceux de *Aesculus sylvatica*, *Quercus rubra*, *Liquidambar styraciflua*, *Salix nigra* et *Pinus taeda*, qui montrent pourtant par ailleurs des profils différents de croissance entre leurs axes plagiotropes et orthotropes (Brown et Sommer, 1992). Pour ces auteurs, la croissance de l'entre-nœud peut être divisé en quatre phases, numérotées successivement de I à IV. Durant la phase I, l'entre-nœud est très petit avec de petites cellules uniformément réparties à travers l'entre-nœud. Ceci correspond à une période active de divisions cellulaires où les cellules de la moelle ont en moyenne environ le tiers de leur taille définitive. Dans la phase suivante (phase II), la taille des cellules s'allongent légèrement (24%), tandis que le nombre de cellules s'accroît ($\times 2,7$). Durant cette phase, la mèresè est distribué uniformément dans tout l'entre-nœud. La phase III correspond à une période d'élongation maximale. La zone de division cellulaire maximale se déplace progressivement vers le milieu et le sommet de l'entre-nœud. Tandis que la fréquence des divisions décroît dans la partie basale, les cellules y atteignent leur taille définitive. Pendant la phase finale (phase IV), la taille finale de l'entre-nœud est des cellules est atteinte, les divisions cellulaires diminuent drastiquement. Ce type de croissance a été observé chez notre variété contrôle.

Quand la taille observée en L1 de l'entre-nœud est mise en parallèle avec sa taille finale, les observations cellulaires faite en L1 pourrait correspondre à des cellules en phase II du profil décrit par Brown et Sommer (1992). En fait, la phase I pourrait correspondre aux nouveaux entre-nœuds en pleine croissance, présents entre les stipules quand les feuilles émergent au sommet de l'apex. Quand les entre-nœuds deviennent visibles à l'extérieur des stipules, la phase II est déjà atteinte.

D'un autre côté, les variations de hauteur de cellules entre L2, L3 et L4 conduisent à rapprocher ces observations de la phase III. Un gradient similaire du sommet à la base de l'entre-nœud pour l'élongation a aussi été décrit pour notre variété contrôle. De plus, le ratio moyen observé par Brown et Sommer en 1992 entre les cellules basales et apicales a été de 0,59, c'est à dire très proche de celui calculé pour le Bourbon (0,60). Seul un point semble diverger entre le profil classique et nos observations : le nombre de cellules présent le long de l'entre-nœud ne change pas significativement entre la phase II et la phase III. Ce contraste pourrait être dû au fait que l'estimation du nombre de cellules dans l'entre-nœud K-2 a été obtenu à partir de la hauteur des cellules en L3 uniquement et dû à la large variation résiduelle de longueur de cellules entre les plantes pour les entre-nœuds en croissance.

IV.2.1.2 L'effet de la mutation Laurina sur le profil classique de croissance de l'entre-nœud

Les observations de croissance d'entre-nœuds sur le mutant BP ne coïncident pas avec celles faites classiquement correspondant au profil de croissance précédemment décrit. Durant la phase II (position L1), les cellules de la moelle sont uniformément de petite taille et les mitoses sont très nombreuses, comme pour la croissance classique des entre-nœuds (Brown et Sommer, 1992 ; Garrison, 1973). Mais durant le développement de la tige (L2, L3 et L4), la mutation Laurina semble arrêter le processus d'élongation cellulaire. Par conséquent, aucun gradient d'hauteur de cellule n'est observé et les cellules gardent la même mesure de longueur qui est d'environ 40 %, soit de – 33% par rapport à la hauteur de cellules de B en L4. Il serait possible de penser que l'élongation cellulaire est juste retardée et qu'elle arrive plus tard. Néanmoins, puisque le processus de lignification est déjà bien avancé en L4, la taille définitive de l'entre-nœud est donc quasiment atteinte. De plus, si les divisions cellulaires ont toujours lieu, leur taux est tout de même moins élevé que chez B, aboutissant à moins de cellules à la fin de la croissance. Puisque la taille de l'entre-nœud est surtout due à la mèresse (Brown et Sommer, 1992; Brown *et al.*, 1994; Garrison, 1973) et que ce processus est particulièrement actif dans la phase I et II, une taille définitive d'entre-nœud chez BP est attendu et est observée dès la phase II.

Chez BP, le nombre de cellules et leur hauteur contribuent à la taille finale de l'entre-nœud. Dans les endroits d'entre-nœud quasiment mature (L4), la hauteur de cellule et leur nombre ont été respectivement de 71% et 40% par rapport au témoin. Si uniquement la hauteur des cellules avait été affectée par la mutation, la longueur finale de l'entre-nœud aurait été de 34 mm chez BP contre 39 mm chez B. Dans la situation opposée (uniquement

une diminution du nombre de cellules), cette longueur finale aurait été de 19 mm. Ainsi, le nombre de cellule est le facteur qui contribue le plus à la longueur finale de l'entre-nœud, ce qui correspond aux observations faites depuis plus d'un siècle (Harting, 1845 ; Moll, 1876).

IV.2.1.3 Les effets de la mutation Laurina sur le diamètre de la moelle

A l'opposé de ce qu'il se passe pour la longueur de l'entre-nœud, le diamètre de la moelle ne change pas de L1 à L4 chez B (ration $L1/L4 = 0,98$) et les effets de la mutation Laurina sont très peu visibles sur ce caractère ($L1/L4 = 0,89$). De surcroît, l'origine des différences entre le mutant et le sauvage pourrait avoir lieu dès les premières étapes de la mise en place des entre-nœuds : aussi tôt que l'apparition des primordiums, le diamètre de l'apex montre un ratio BP/B de 0,79 (voir partie III). Ceci suggère une amplification des différences durant la phase I de Brown et Sommer (1992).

IV.2.1.4 Le comportement de BP est similaire a celui d'*Helianthus annuus* L en condition de stress hydrique

Le profil de croissance des entre-nœuds du mutant Laurina montre des similarités évidentes avec d'*Helianthus annuus* L en condition de stress hydrique (Sommer *et al.*, 1999b). Chez le tournesol, les différences morphologiques les plus importantes entre le contrôle et les plantes stressées furent une diminution générale de la croissance (-30 à -51%) et une réduction de la taille des feuilles. Le nombre et la taille des cellules de la moelle ont diminué simultanément de 22%. Cette comparaison entre le profil de croissance de BP et des plantes stressées d'*Helianthus annuus* L est intéressant puisque BP est bien connu pour sa résistance à la sécheresse, c'est d'ailleurs sur cette caractéristique qu'il a été sélectionné (Chevalier, 1947). Une relation pourrait exister entre cette résistance et l'absence d'élongation cellulaire. La même modification induite par la mutation Laurina pourrait être à l'origine de sa résistance à la sécheresse et l'absence d'élongation cellulaire. La plupart des études sur les relations hydriques chez les plantes supérieures ont montré que le processus de division cellulaire est moins sensible au déficit hydrique que celui d'élongation cellulaire (Hsiao, 1973; Slatyer, 1967).

IV.2.2 Perspectives

Trouver l'origine physiologique du nanisme de BP constitue un futur challenge. La croissance des entre-nœuds est souvent régulée par des hormones (Kende et Zeevaart, 1997;

Reid, 1993). La mutation Laurina pourrait réguler la croissance de l'entre-nœud à travers la régulation hormonale.

Parmi tous les signaux endogènes qui pourraient être déficient chez les plantes naines, les gibbérellines (GAs) sont un candidat évident. En effet, une des premiers effets des GAs est de favoriser l'élongation cellulaire (Daykin *et al.*, 1997), processus qui est supprimé chez BP. Un autre rôle des GAs est de stimuler l'activité méristématique subapicale (Sachs *et al.*, 1959a et b ; Sachs *et al.*, 1960; Sommer *et al.*, 1999a). Par exemple, chez *Xanthium pennsylvanicum*, l'application exogène de GAs résulte en un agrandissement du méristème apical caulinaire grâce à une mérése accrue (Maksymowych et Erickson, 1977; Maksymowych et Maksymowych, 1973). La présence d'un méristème apical plus réduit chez BP va dans le sens d'une déficience en GAs.

Une déficience partielle en auxines pourrait aussi expliquer les effets de la mutation Laurina. Chez le pois, des variations de concentrations d'IAA supplée par le bourgeon terminal dans les jeunes entre-nœuds pourraient résulter à de rapides modifications de l'expression des gènes et en particulier sur les niveaux de GAs (O'Neill and Ross, 2002). De l'autre coté, les auxines peuvent aussi stimuler directement la division cellulaire (Klee et Estelle, 1991; Rayle et Cleland, 1977). Par conséquent, la déficience d'auxine pourrait expliquer successivement la déficience en GAs et l'arrêt d'élongation cellulaire. De plus, ceci pourrait expliquer la perte sévère de dominance apicale chez BP dans la serre sous certaines conditions (données non présentées).

Les brassinostéroïdes pourraient aussi être impliquées. Un système complètement fonctionnel de brassinostéroïde (BR) est nécessaire pour une réponse totale aux GAs, auxines et pour une bonne dé-étiolation (Azpiroz *et al.*, 1998). Les BRs chez le riz agissent principalement dans l'élongation des entre-nœuds, l'accroissement et le recourbement du limbe foliaire et un bon étiolement au noir (Mori *et al.*, 2002; Yamamuro *et al.*, 2000). BRs et les auxines régulent indépendamment plusieurs gènes impliqués dans l'expansion cellulaire ou l'organisation de la paroi cellulaire (Goda *et al.*, 2004). En conséquence, une déficience en BRs pourrait aussi être une des conséquences primaires de la mutation Laurina.

IV.3 *Effet de la mutation sur le port de l'arbre*

Le port chez les plantes dépend de la distribution des branches latérales (modification des paramètres de phyllotaxie), de l'intensité et la durée de croissance des rameaux, de l'angle de branchement entre les plagiotropes et les orthotropes, du rapport des rythmes de croissance

entre les tiges orthotropes et les rameaux plagiotropes et de l'ontogénie des rameaux (monopodial contre sympodial) (Steeves et Sussex, 1989 ; Sussex et Kerk, 2001). Il peut aussi être affecté par un déphasage temporel entre les axes de niveaux différents (principal, secondaire, tertiaire) (Franquin, 1974, 1985). Parmi tous ces caractères, certains sont clairement inchangés entre B et BP. C'est le cas de l'ontogénie des branches, de la phyllotaxie et du décalage temporel, communs aux deux variétés. Si le nanisme touche avec la même intensité les axes plagiotropes et orthotropes, il est uniquement attendu une miniaturisation de l'arbre comme chez la variété Caturra, et non pas un changement dans son port. Ce n'est pas le cas du Bourbon pointu, atteint effectivement de nanisme, mais dont le port est aussi modifié. D'après nos résultats, la mutation n'a pas eu d'impact sur l'angle que fait le plagiotrope avec l'axe orthotrope. En revanche, une différence de croissance relative entre les axes plagiotropes et orthotropes a été mise en évidence entre le Bourbon pointu et le Bourbon, différence affectant les entre-nœuds les plus jeunes de l'axe orthotrope. Les conclusions portées ici ne sont valables que chez des arbres jeunes, mais peuvent être extrapolées chez les arbres adultes à la zone sommitale dite « des feuilles », telle qu'elle a été défini par Beaumont (1939).

IV.3.1 La croissance relative entre les axes plagiotropes et orthotropes à l'origine du changement de port induit par la mutation Laurina

L'effet de nanisme de la mutation Laurina sur la longueur de l'entre-nœud est plus prononcé sur le plagiotrope que sur l'orthotrope. Chez les plants jeunes, l'émergence de nouveaux entre-nœuds sur les plagiotropes est synchronisée sur celle de l'axe orthotrope comme dans les modèles de Franquin sans déphasage (1974, 1985) : l'apparition d'un nouvel entre-nœud orthotrope s'accompagne du même processus sur chaque plagiotrope. Ainsi, la valeur asymptotique du ratio R_i étudié ici reflète le rapport de taille entre l'entre-nœud d'un plagiotrope et celui de l'axe orthotrope en fin de croissance. Ce rapport est de 0,58 chez le Bourbon pointu et de 0,81 chez le Bourbon. Chez le mutant, la longueur moyenne de l'entre-nœud en fin de croissance est ainsi de 4,1 et 2,4 cm respectivement chez l'orthotrope et le plagiotrope. Ces longueurs respectives sont de 9,3 et de 7,5 cm chez le Bourbon. Cet effet différentiel du nanisme explique la variation d'angle β induite par la mutation accentuant la forme pyramidale en sapin de Noël du Bourbon pointu.

La fin de croissance de l'entre-nœud dépend à la fois de la variété et du type d'axe. Chez le Bourbon, l'entre-nœud cesse de croître à partir de la position K-2, c.a.d. après trois

plastochrones, aussi bien sur l'orthotrope que sur le plagiotrope. Chez le mutant, il cesse de croître dès la position K sur l'orthotrope, mais toujours à partir de la position K-2 sur le plagiotrope. Ainsi, la taille finale moyenne de 4,1 cm de l'entre-nœud orthotrope est réalisée en un plastochrome, tandis que celle de 2,4 cm observée sur le plagiotrope est atteinte après trois plastochrones. L'élongation de l'entre-nœud est quasiment 5 fois plus lente sur le plagiotrope.

Enfin, c'est la non-linéarité de la relation entre R_i et i qui explique la forme parabolique et celle conique des sommets respectifs du Bourbon et du Bourbon pointu. Apparemment le premier entre-nœud de chaque plagiotrope aurait une taille supérieure à la moyenne.

Le nombre de cellules explique les variations de tailles de l'entre-nœud le plus jeune (K), que ce soit chez l'axe orthotrope ou chez les plagiotropes. Chez le Bourbon pointu, mais c'est aussi vrai chez le Bourbon, la hauteur des cellules de l'entre-nœud le plus jeune (K) est la même que celui-ci appartienne à l'axe orthotrope ou aux axes plagiotropes P1 et P3. La taille de cet entre-nœud augmentant de l'orthotrope au plagiotrope P1, puis de P1 à P3, cette variation est due au nombre de cellules. Le classement d'après ce nombre est le suivant : orthotrope > plagiotrope P1 > plagiotrope P2 = plagiotrope P3 = plagiotrope P4, etc. Il suggère une influence positive de l'apex caulinaire orthotrope sur la mèresse en fonction de la distance à ce dernier.

IV.3.2 *L'angle de branchement entre les axes plagiotropes et orthotropes chez le mutant reste typique du type Bourbon*

Chez la plupart des variétés de *C. arabica*, les angles varient de 50 à 85° (plagiotrope sub-horizontal), avec une moyenne de 67°. Dans le cas de *C. arabica* L. var *erecta* Ottoländer, l'angle est compris entre 11° et 41° avec une moyenne de 26° (Krug *et al.*, 1939). L'héritabilité génétique de la mutation *erecta* montre une ségrégation mendélienne avec un gène majeur : dans les hybrides « catuai x *erecta* », l'angle est de 31° en moyenne. Chez les F2, il y a 22 % d'*erecta* (14°), 51% de semi-*erecta* (31°) et 27 % de sauvage Catuai (50°) (Sera *et al.*, 2001). De ces résultats, la variété *erecta* décrite par Krug *et al.* (1939) inclurait en fait des *erecta* et des semi-*erecta*.

Surtout, dans l'expérience de Sera *et al.* (2001), il ressort un angle de branchement des lignées pures de la variété Catuai de 50°, cette valeur correspondant à nos résultats sur BP et

B. Ceci est tout à fait cohérent avec le fait que l'un des parents du Catuai est génétiquement originaire de la souche Bourbon.

IV.3.3 Conclusions et perspectives

En fait, la différence de forme entre B et BP est expliquée en grande partie par la différence de rythme de croissance entre les axes plagiotropes et orthotropes. La croissance des rameaux plagiotropes est affectée car ils sont plus réduits, mais leur mode de croissance ne semble pas touché.

Il serait intéressant de vérifier si les cellules s'allongent réellement dans les plagiotropes. Ceci pourrait amener d'autres conclusions sur les modes de croissance et aboutir à une modélisation de la croissance de l'arbre.

La forme de l'arbre, au niveau physiologique, peut dépendre de plusieurs facteurs, dont l'action des hormones. Ces dernières agissent à tous les niveaux de la morphogénèse végétale : sur la mèresse, l'auxèse, mais aussi sur la dominance apicale, la levée de dormance des bourgeons, les phénomènes de tropisme... De nombreux mutants atteints dans leur morphologie sont décrits comme ayant une balance hormonale affectée. Toutes ces observations se recoupent avec les précédentes pour avancer l'hypothèse d'un dérèglement hormonal, au niveau de la synthèse, de leur effet au niveau des récepteurs ou encore au niveau de leur dégradation. Si la mutation Laurina affecte un de ces niveaux pour une hormone donnée, il sera alors possible de d'identifier des gènes-candidats et de tester leur expression.

IV.4 La mutation Laurina modifie des phénomènes directement lié à l'action d'hormones

En règle générale, les mutations liées aux hormones peuvent être classées en deux groupes : celles touchant le taux d'hormone, avec les mutants dits « de synthèse », et celles affectant la réponse à l'hormone, avec les mutants dits « de réponse ».

Les mutants de synthèse résultent souvent d'une mutation dans une des étapes de la voie de biosynthèse de l'hormone. Les mutants nains déficients en GA1 du pois et du maïs (Ingram *et al.*, 1986 ; Ingram et Reid, 1987 ; Phinney, 1984 ; Fujioka *et al.*, 1988 ; Reid, 1986 ; Reid *et al.*, 1992) et les mutants ABA de la tomate (Tal et Nevo, 1973 ; Neill et Horgan, 1985) appartiennent à cette catégorie. Des mutants surproduisant l'hormone ont aussi été rapportés, comme pour les cytokinines chez la mousse *Physcomitrella patens* (Wang *et al.*, 1981), pour les GA1 chez le pois (Reid *et al.*, 1992) et pour l'éthylène chez *Arabidopsis*

(Guzman et Ecker, 1990). La fréquence de ce type de mutant est néanmoins faible. Enfin, les mutants ayant un faible taux d'hormone, dû à un accroissement de la complexation ou du catabolisme de l'hormone active, appartiennent aussi à cette catégorie, mais pour l'instant aucune mutation de ce type n'a été trouvée chez les plantes supérieures.

La majorité des mutations liées aux hormones appartiennent à la seconde catégorie. Les mutants affectés dans la reconnaissance de l'hormone, suite à une modification des récepteurs, ont un phénotype identique aux mutants dits de synthèse, mais ne répondent pas à l'application d'hormone exogène. Ce type de mutant a été décrit chez le pois (*la cry slender* : Potts *et al.*, 1985), le maïs (*D8* : Fujioka *et al.*, 1988 ; Harberd et Freeling 1989) et l'orge (*sln* : Chandler 1988 ; Lanahan et Ho, 1988). Cette seconde catégorie de mutation se subdivise en sous-classes selon que la mutation influence le taux de récepteurs (avec les « receptive mutants »), l'affinité du récepteur vis-à-vis de l'hormone active (avec les « affinity mutants ») ou l'amplitude de la réponse induite (avec les « response capacity mutants ») (Firn 1986). Enfin, les mutants peuvent aussi être classés selon leur réponse à l'application d'hormones exogènes : 1/ insensibles à l'application et 2/ réponse saturée, même en présence d'inhibiteur de synthèse de l'hormone (« constitutive response ») (Potts *et al.*, 1985 ; Guzman et Ecker, 1990).

Les mutations bloquant la synthèse ou la réponse à la gibbérelline (GA) conduisent très souvent à un phénotype nain. Ceci a été démontré par les études pionnières de Brian et Hemming en 1955 et de Phinney en 1956 sur les mutants de pois et de maïs. Les GAs sont non seulement nécessaires à l'élongation de la tige, mais participent aussi dans la plupart, si ce n'est la totalité, des étapes du développement des plantes (article de synthèse de Hedden et Phillips de 2000 ; Busov *et al.*, 2006).

Les voies d'action des GAs sont encore très méconnues. Chez *Arabidopsis* et d'autres plantes, la réponse à la gibbérelline est transmise majoritairement par des protéines médiatrices dont GAI, RGA et RGL1-3, contenant un domaine fonctionnel DELLA. Des délétions complètes ou des substitutions synonymes de ce domaine provoquent des mutations résultant en l'inhibition d'une ou de plusieurs réponses aux GAs (Peng *et al.*, 1997) et ces mutants DELLA sont généralement nains. Chez des mutants transgéniques de peupliers (*Populus* sp.) ne possédant plus ce domaine DELLA (nommés *gai* et *rgl1*), des modifications pléiotropiques dans la morphologie mais surtout dans les profils métaboliques ont été relevées (Busov *et al.*, 2006). Par exemple, dans les feuilles, une absence de réponse à la GA semble provoquer une diminution du flux de carbone vers la voie de biosynthèse de la lignine et une

reconversion de ce flux vers le métabolisme secondaire, incluant des variations dans la quantité de phénols, glucosides phénolique et les conjugués d'acide phénolique. Les plantes transgéniques accumulent ainsi par exemple l'acide 3-O-cafferoylquinic, mais ils ont moins d'acide quinique. Ce déclin est associé à celui d'autres conjugués d'acide phénolique, comme les galloylglucoside et la caffeoylglucoside. La mutation Laurina est bien connue pour les modifications apportée à l'architecture de l'arbre, mais aussi pour les changements induits dans le métabolisme secondaire (moitié moins de caféine dans les graines, moins d'acides chlorogéniques...).

En plus du nanisme, ces observations font des GA l'hormone candidate idéale. Elles ont un contrôle sur l'architecture globale de la plante et les allocations de biomasse en régulant de manière coordonnée un certain nombre de voies de biosynthèse des métabolismes primaire et secondaire. Notre but a été de savoir si l'action de GAs exogène permettait 1) de classer le Bourbon pointu dans une des catégories décrites au dessus concernant les GAs, et 2) de conclure quant à l'implication des GAs dans la mutation Laurina. Nous discuterons tout d'abord sur l'action de GA exogène sur la variété témoin Bourbon avant de chercher à la comprendre sur le Bourbon pointu. A partir de ces résultats, une synthèse sera faite et présentera des hypothèses quant aux modifications induites par la mutation Laurina sur l'action certaines hormones endogènes.

IV.4.1 *Le Bourbon répond classiquement à l'application de GA*

Le développement végétatif du Bourbon réagit d'une façon attendue à l'application exogène de GA. Trois réponses bien distinctes similaires à celles observées lors du même type d'expérience sur *Xanthium pennsylvanicum* ont été obtenues (Maksymowych et Maksymowych, 1973) :

1) Elongation de la tige et des entre-nœuds. Un mois après le traitement, chez le Bourbon, seul le dernier entre-nœud formé s'est avéré sensible à l'action de GA exogène. Chez les témoins, l'accroissement final de cet entre-nœud est de 121 mm contre 530 mm chez les plantes traitées (x 4,4). Cette action de la GA sur l'élongation est visible un mois plus tard chez tous les nouveaux entre-nœuds : chez les plantes traitées ils ont alors tous le double de la longueur de ceux des témoins. Ceci est à rapprocher des résultats obtenus chez *Xanthium*. L'augmentation de taille de la plante témoin après 33 jours y est de 27 cm contre 95 cm chez la plante traitée. Cette évolution est liée à la longueur de l'entre-nœud qui est multipliée par

trois en fin de croissance sous l'effet de la GA. Ce facteur est de 2,8 pour l'entre-nœud situé au dessus et de 1,9 pour celui situé en dessous.

Si le Bourbon suit totalement le comportement classique de plants traités à la GA, l'accroissement de longueur des entre-nœuds serait dû à une mèresse plus importante. En effet, l'application de GA exogène conduit majoritairement à des stimulations de l'activité mitotique dans la zone subapicale méristématique (Sachs *et al.*, 1959, 1960). Lors de l'étude sur le *Xanthium* (Maksymowych et Maksymowych, 1973), les entre-nœuds traités s'allongent de 128 %, alors que la taille de leurs cellules n'augmente que de 22%, par rapport à celle des témoins, impliquant la multiplication cellulaire ;

2) Modification de la forme de la feuille. Chez le Bourbon, la GA conduit à des feuilles plus fines dont la largeur a été diminuée de 57 % et la longueur de 27 %. Un tel changement de forme de la feuille est aussi observée chez *Xanthium* où elle passe de deltoïde à lancéolée après application de GA, tandis que la surface foliaire diminue de moitié ;

3) Diminution du plastochrone. Chez le Bourbon, le traitement double le nombre de nouveaux entre-nœuds émis, c.a.d. divise par deux le plastochrone. Toujours dans le cas du *Xanthium*, le plastochrone égal à 3,3 jours chez le témoin devient égal à 1,9 jours après le traitement (-43%).

Les effets de GA exogène relevés sur le Bourbon sont donc bien ceux attendus. Certains de ceux relevés sur le Bourbon pointu sont plus inattendus.

IV.4.2 *La mutation Laurina modifie la réponse à l'application de GA exogène*

IV.4.2.1 Le Bourbon pointu répond à la GA exogène

Le Bourbon pointu n'est pas un mutant insensible à l'action de GA exogène et certaines de ses réponses sont attendues d'une telle expérience :

- Les nouveaux entre-nœuds formés au bout d'un mois après la fin du traitement ont une taille deux fois plus importante, comme chez les Bourbon traités. De surcroît, l'entre-nœud K au temps T1 atteint la longueur de ceux des Bourbon non traités. La GA exogène permet ainsi de reproduire le phénotype sauvage, du moins au niveau de l'accroissement des entre-nœuds.

Les entre-nœuds K-1 et K-2, comme pour le Bourbon, ne sont pas touchés par le traitement. Cette observation est à rapprocher des traitements à la GA sur des branches latérales de *Liquidambar* nains (Sommer *et al.*, 1999). Chez cette plante, le bourgeon

démarrant au printemps contient environ neuf entre-noeuds pré-formés. L'effet de la GA3 sur la longueur ne se fait sentir nettement qu'à partir du 6^{ème} entre-noeud et est le plus fort pour le 9^{ème} entre-noeud pré-formé (+1050%). La GA agirait mieux sur les entre-nœuds les plus immatures. Dans la partie précédente concernant la différence de croissance des entre-nœuds entre B et BP, il a été montré que la phase de divisions cellulaires cesse chez BP mais qu'elle n'y est pas remplacée par celle d'élongation cellulaire. L'absence d'action de GA exogène sur les entre-nœuds K-1 et K-2 est la conséquence de son faible impact sur l'auxèse. Ceci va dans le sens d'études menées depuis longtemps menées (Sommer *et al.*, 1999, Sachs *et al.*, 1959).

- La modification de la forme de la feuille est la même les Bourbon pointu et les Bourbon. Dans les deux cas, la feuille devient nettement plus fine, et ceci est surtout dû à une diminution plus importante de sa largeur.

Pour l'élongation de l'entre-nœud et la forme de la feuille, le Bourbon pointu se classe ainsi dans la catégorie des mutants dits « de synthèse ». Le nanisme des entre-nœuds de l'axe orthotrope du Bourbon pointu est dû principalement à une moindre mèresse (voir partie précédente). Cette dernière, accrue par l'apport de GA (Sachs *et al.*, 1959, 1960 ; Sommer *et al.*, 1999), pourrait atteindre chez les mutants traitées le niveau du Bourbon non traité.

IV.4.2.2 La réponse à la GA sur le Bourbon pointu n'est pas complète

Suite à l'application de GA, deux réponses du Bourbon pointu sont néanmoins inattendues :

- L'absence d'effet au niveau du plastochrone est surprenante. Chez le mutant nain de *Liquidambar* (Sommer *et al.*, 1999), l'application de GA exogène provoque l'apparition de cinq nouveaux entre-noeuds participant pour 30% à l'accroissement de longueur de la tige. Ces observations, ainsi que celles faites sur le Bourbon, ne correspondent pas à celles observés chez le Bourbon pointu. La mutation Laurina provoquerait donc le blocage de réponse à ce niveau. Deux hypothèses principales pourraient être émises : 1) les récepteurs à la GA servant à ce type de réponse sont saturés naturellement chez le Bourbon pointu, 2) ces mêmes récepteurs n'existent pas ou ne sont pas fonctionnels.

- L'accroissement relatif de l'entre-nœud K sous l'effet de la GA est moins important que chez le Bourbon. Cette différence de réponse n'a plus été relevée chez les nouveaux entre-nœuds formés (doublement de longueur des entre-noeuds aussi bien chez le Bourbon que chez le Bourbon pointu). La GA semble agir très précocement pour avoir le même effet chez le Bourbon et le Bourbon pointu sur les entre-nœud K+1, K+2 et suivants. Ce n'est pas le cas de l'entre-nœud K déjà formé dans l'apex lors du début du traitement ;

La diminution du plastochrone et l'accroissement de la taille de l'entre-nœud seraient en fait deux phénomènes distincts touchés par la GA exogène. Elle agirait, au moins, à deux niveaux : 1) dans la zone subapical méristématique pour l'accroissement de taille de l'entre-nœud ; 2) dans le méristème apical caulinaire, où la diminution du plastochrone se répercute.

IV.4.3 Hypothèses portant sur la modification de l'action d'hormones endogènes par la mutation *Laurina*

Cette étude portant sur l'action de GA endogène permet de faire ressortir certaines hypothèses quant aux modifications induites par la mutation *Laurina* sur l'action d'hormones endogènes.

Entre autres, elle permet de faire des hypothèses sur les auxines. Trois points sont à relever :

- Point 1 : Les feuilles des Bourbon pointu sont plus petites, mais ont la même forme que celles des Bourbon. Or l'auxine exogène diminue justement la surface des feuilles sans en modifier la forme, contrairement à la GA. Ceci a été démontré par une étude basée sur les effets de l'applications exogène de GA et d'auxine (AIA), appliquées séparément ou en conjuguées sur *Xanthium pennsylvanicum* (Orkwiszewski *et al.*, 1979).

- Point 2 : Une dose trop importante d'auxine inhibe la croissance de l'entre-nœud traité (Orkwiszewski *et al.*, 1979). L'auxine agit d'ailleurs au niveau de l'élongation cellulaire (Rayle et Cleland, 1977), inexistante dans la tige orthotrope du Bourbon pointu.

- Point 3 : Le plastochrone n'est pas modifié par un traitement exogène à l'auxine seule (Orkwiszewski *et al.*, 1979) et les plastochrones du Bourbon et du Bourbon pointu sont naturellement identiques.

L'hypothèse d'une surproduction d'auxine chez le Bourbon pointu est une conclusion possible de ces points successifs. Mais elle ne permet pas d'expliquer l'inefficacité de l'action de GA exogène sur le plastochrone du Bourbon par exemple.

La suite de cette étude serait néanmoins de comprendre le lien existant, dû à la mutation *Laurina*, au moins entre (Figure II.14) 1) une modification possible de la synthèse de la GA dans les zones méristématiques subapicales intervenant dans l'élongation des entre-nœuds et plus précisément de leur nombre final de cellules, 2) une modification possible de l'efficacité des récepteurs à la GA dans les zones méristématiques intervenant dans le contrôle du plastochrone, 3) un blocage de l'élongation cellulaire dans l'axe orthotrope et une

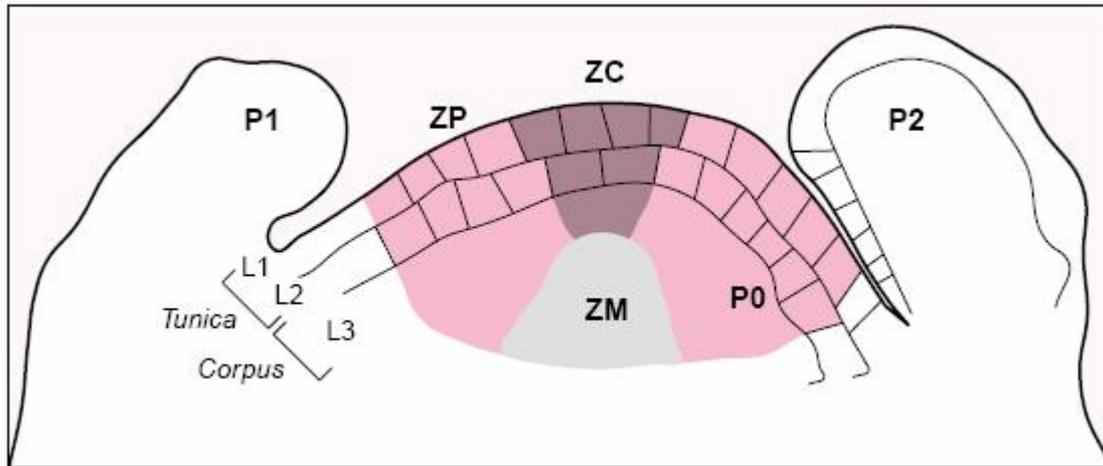


Figure II.14 : Description histologique de l'organisation du méristème apical avec indications des points où agirait la GA exogène.

Les assises externes, L1 et L2, formant la tunica, sont caractérisées par l'orientation anticlinale (perpendiculaire à la surface du méristème) des plans de division. Les assises sous-jacentes, L3, ou corpus, ne présentent pas de plans de division préférentiels. Trois domaines, ou zones, ont été définis sur la base de critères cytologiques, tels que la taille cellulaire, la densité cytoplasmique et le taux de prolifération cellulaire : la zone centrale (ZC) contient les cellules souches assurant le maintien du méristème, la zone périphérique (ZP) est composée de cellules plus petites et se divisant plus rapidement, permettant l'initiation des primordiums d'organes (P1 et P2). La formation du futur primordium (P0) débute avec une augmentation de la fréquence des divisions périclinales (parallèles à la surface du méristème) dans l'assise L2. La modification de plastochrone et de forme des feuilles mature pourrait avoir lieu à ce niveau. La zone médullaire (ZM) comporte des cellules plus grandes, allongées, et produit les tissus internes de la tige. La GA exogène agit peut-être à ce niveau sur le plastochrone (d'après Autran et Traas, 2001).

diminution de la taille des feuilles sans modification de leur forme. Ces deux points pouvant peut-être expliqué par une surproduction d'auxine.

Doser les formes actives et inactives de plusieurs hormones dans des organes bien ciblés comme les jeunes feuilles ou les apex pourrait apporter certains éléments de réponse. Néanmoins, il est bien de garder en mémoire la présence d'interactions liant les hormones entre elles et qu'une déficience dans la synthèse de l'une d'entre elles peut parfois être due à la synthèse d'une autre (O'Neill et Ross, 2002, Goda *et al.*, 2004 ; Ross *et al.*, 2003). Par exemple, l'auxine agit sur la biosynthèse de gibbérellines dans les tiges de pois en régulant l'enzyme convertissant la GA₁ inactive en GA₂₀ (O'Neill et Ross, 2002).

Afin de continuer sur l'hypothèse d'une implication des GA dans l'action de la mutation Laurina, une approche gène-candidat pourrait être mise en place. Elle étudierait des gènes identifiés chez certains mutants de GAs. La recherche de tels gènes serait possible dans les banques soustraites de Bourbon et de Bourbon pointu construites durant cette thèse. Plusieurs gènes semblent d'intérêt, citons par exemple le gène de gibberellin 7-oxidase et de kaurene synthase, un facteur de transcription répondant à l'auxine ou encore un facteur d'élongation cellulaire.

Chapitre III

Effet de la mutation

Laurina au niveau du

transcriptome

Un proverbe arabe dit que le café « procure au musulman le ravissement avant même son entrée au Paradis » et que « celui qui meurt avec du café dans le ventre ne risque pas les flammes de l'enfer, car le café dispose au bien et favorise le succès des pieux ».

(www.cirad.fr/fr/web_savoir/curieux/brochures/cafe/pdf/brocafe1.pdf)

I Introduction

En préambule de cette partie sur la caractérisation des effets de la mutation *Laurina* au niveau du transcriptome, le polymorphisme entre Bourbon et Bourbon pointu a été analysé par la technique des AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*). Les buts étaient de vérifier : 1) l'homogénéité génétique pour chacune des deux variétés et, 2) la très forte proximité génétique entre elles.

Les caféiers *C. arabica* étant tétraploïdes et la taille de leur génome atteignant environ 1 150 Mb, l'identification d'un seul gène muté est aléatoire et nécessiterait de disposer de nombreuses descendances en ségrégation, afin d'obtenir une carte génétique saturée avec des marqueurs qui encadrent au mieux le gène concerné. Les caféiers étant des espèces ligneuses pérennes dont la production des premiers fruits requiert au minimum un âge physiologique de trois à quatre ans, une telle approche est très longue. De plus, la faible variabilité génétique chez l'Arabica ne facilite pas l'obtention de très nombreux marqueurs polymorphes. La recherche d'une telle mutation chez *C. arabica*, selon une approche de génomique structurale a ainsi une faible probabilité d'aboutir dans les temps impartis à une thèse, en l'absence du matériel végétal nécessaire. De surcroît, une mutation *sensu stricto* est alors sensée être due à une modification de l'enchaînement nucléotidique de l'ADN, ce qui n'est pas l'hypothèse la plus plausible du fait de la présence de réversions.

En revanche, cette mutation a des effets multiples à la fois entre autres sur le port de l'arbre, la forme des grains et leur composition biochimique. Ceci implique une modification dans le fonctionnement et/ou la régulation d'un grand nombre de gènes. Dans ce contexte, une analyse comparative des transcriptomes et/ou protéomes, entre la variété Bourbon pointu et Bourbon nous a paru la plus pertinente pour caractériser les effets de la mutation sur l'expression des gènes.

La première étape a été de choisir la méthode la mieux adaptée pour obtenir un grand nombre de ces séquences, directement ou indirectement liées à la mutation *Laurina*. Différentes techniques, développées ces dernières années, permettent en effet l'obtention de tels marqueurs. Ce sont, notamment, la ddRT-PCR (*differential display* RT-PCR) (Liang *et al.*, 1992), le « RNA fingerprinting » par primer PCR arbitraire (Welsh *et al.*, 1992), les banques SSH (Diatchenko *et al.*, 1996), le cDNA-AFLP (Bachem *et al.*, 1996 ; Money *et al.*, 1996), ou encore le SAGE (*Serial Analysis on Gene Expression*) (Velculescu *et al.*, 1995) (voir partie I).

La technique de SSH (*Hybridation Suppressive Soustractive*) a été retenue. Développée par Diatchenko *et al.* (1996), elle permet d'enrichir l'échantillon analysé en ADNc différentiellement exprimés par rapport à une autre condition définie. Elle se caractérise par deux étapes-clé : 1) la sélection des gènes différentiellement entre deux conditions et 2) la normalisation (étape dite « suppressive »), enrichissant la banque SSH en messagers rares et diminuant la fréquence des messagers les plus abondants. Des ARN, obtenus à partir de la partie aérienne de plantules au stade cotylédonaire (présentant déjà un phénotype différent entre les deux variétés), ont été utilisés afin d'obtenir deux banques SSH, une banque témoin (la SSHb enrichie en séquences exprimées chez le Bourbon) et une banque enrichie en séquences exprimées chez le Bourbon pointu (la SSHbp). Après ligation dans des plasmides bactériens, 1052 clones ont été séquencés pour chacune des banques. Le résultat du séquençage a été analysé grâce au logiciel ESTdb (www.mpl.ird.fr/bioinfo) développé à l'IRD de Montpellier. Les ESTs ont été regroupées par classe selon leur fonction déterminée par alignement des séquences dans les bases de données internationales. Cette étape a permis de surcroît l'obtention d'ESTs couvrant un grand nombre de fonctions physiologiques.

Dans un second temps, cette approche a été couplée à une étape de tri à haut débit afin de confirmer leur expression différentielle entre Bourbon et Bourbon pointu. Les puces à ADN sont aujourd'hui largement décrites dans la littérature et jouent un rôle prépondérant, tant par leur relative simplicité de mise en oeuvre que par leurs multiples champs d'application. Elles permettent l'analyse simultanée de l'expression de plusieurs milliers de gènes dans un échantillon biologique, dans des conditions environnementales ou génétiques multiples (Aharoni et Vorst, 2002 ; Lockhart et Winzeler, 2000 ; Zhu et Wang, 2000). Des filtres de nylon moyenne densité comportant la totalité de chacune des banques ont été élaborés par dépôt d'ADNc (*macro-array*). Ils ont été hybridés par des ADNc marqués radioactivement. Après la mise au point d'une méthode d'analyse statistique suffisamment puissante pour l'analyse de nos résultats d'hybridation, certains des gènes mis en évidence comme étant différentiellement exprimés ont été validés par RT-PCR semi-quantitative. Ces gènes représentent un large éventail de voies métaboliques et de fonctions.

II Matériel et Méthodes

II.1 Analyse préliminaire de la variabilité génétique en AFLP

II.1.1 Matériel végétal

Les échantillons de feuilles à l'origine d'une première analyse en AFLP sont les suivants :

- six plants de Bourbon pointu originaires de la Réunion (ref* BP1 à BP6);
- six plants de Bourbon originaires de la Réunion (ref* BR1 à BR6);
- un plant de la variété Typica originaire d'Amérique du Sud (ref* T996);
- et un plant de Bourbon provenant aussi d'Amérique du Sud (ref* T995).

Une seconde analyse a été faite plus spécifiquement à partir de l'ADN extraits des feuilles de dix plantes de Bourbon et de Bourbon pointu. Dans ces derniers cas, les dix plants sont issus d'un même parent.

II.1.2 Extraction au sorbitol et dosage de l'ADN

La méthode utilisée permet d'extraire les noyaux et donc de s'affranchir de l'ADN mitochondrial et autres contaminants cellulaires (Technique mise au point sur le café par P. Trouslot, Genetrop, IRD Montpellier).

Pour chaque échantillon de feuilles, 1g de poudre fine obtenue après broyage manuel au mortier est mis en suspension dans un tube Falcon de 50 ml contenant un tampon d'extraction (0,35 M Sorbitol, 0,1 M Tris, 0,005 M EDTA, pH = 8, 0,5 % Bisulfite de sodium). Les débris cellulaires sont séparés des noyaux par filtration à l'aide d'une toile à bluter. Le filtrat est alors reparti équitablement dans deux tubes Falcon, le volume étant ramené à 50 ml par ajout du tampon d'extraction (soit un volume total de 100 ml de filtrat pour chaque échantillon de feuilles). L'élimination des composés solubles, tels que les polysaccharides et les protéines, est faite par centrifugation des filtrats à 4000g pendant 20 minutes. Les deux culots sont ensuite rassemblés dans 20ml de tampon de lyse (0,1 M Tris, 1,25 M NaCl, 0,02 M EDTA, 4% Matab, pH = 8,0). A ce stade, il est possible de congeler les noyaux à -20 °C, sans les endommager. Leur lyse est réalisée dans un bain-marie à 65 °C pendant quatre heures, en agitant manuellement les tubes toutes les 30 minutes.

* References des plants dans la serre tropicale de l'IRD de Montpellier, France

II.1.3 Purification de l'ADN

La solution est refroidie pendant cinq minutes sur la paillasse, puis additionnée de 20 ml de chloroforme isoamylique (24/1). Elle est ensuite agitée au vortex et centrifugée à 4000g à nouveau pendant dix minutes. Le surnageant aqueux est alors récupéré. Pour une bonne purification, l'opération est répétée une seconde fois. Après addition de 25 µl de Rnase (10 mg/ml), le surnageant est mis à incuber à 37 °C pendant 30 minutes à l'étuve. L'ADN est alors précipité dans un volume équivalent d'isopropanol, et l'ensemble est centrifugé à 4000g pendant dix minutes. Le culot est enfin resuspendu dans 750 µl de tampon TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH = 8,0). L'ADN est alors précipité par l'addition de 75 µl d'acétate de sodium (3 M, pH 5,2) et 750 µl d'isopropanol à température ambiante. Il est culotté par centrifugation à 15 000g pendant cinq minutes.

Après élimination du surnageant, un rinçage est effectué par ajout d'éthanol 70% sur le culot, suivi d'une centrifugation à 15000g pendant cinq minutes. Le culot est séché au Speed-vac pendant 15 minutes, et dissout ensuite dans 100 à 200, voire 300 à 400 µl de TE, jusqu'à solubilisation totale, selon le volume du culot. La solution d'ADN ainsi obtenue est alors conservée au congélateur à -20 °C.

II.1.4 Dosage de l'ADN

Le dosage de l'ADN est réalisé par électrophorèse, permettant à la fois d'évaluer sa quantité et d'en apprécier sa qualité (bonne migration, pas de dégradation). L'électrophorèse est réalisée sur mini-gel d'agarose à 1% (0,4 g d'agarose dans 40 ml de TAE 1X). Pour chaque solution à doser, deux dilutions (1/50 et 1/100) sont préparées. La migration est faite à 50V, puis la révélation dans du BET (0,5 µg/ml). Deux marqueurs de poids moléculaires constitués d'ADN du phage lambda digéré par Hind III et EcoRI sont utilisés. Les ADN sont aussi dosés par spectrophotométrie UV à 260 nm. La relation $[C]=50 \cdot A_{260nm} \cdot \text{facteur dilution}$ permet d'obtenir la concentration de la solution en ADN (exprimée en $\text{ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$). Le ratio $A_{260/280}$ donne une estimation de leur pureté.

II.1.5 Protocole AFLP

La technique AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) est basée sur l'amplification sélective par PCR (*Polymerase Chain Reaction*) de fragments de restriction issus d'une digestion génomique totale (Zabeau et Vos, 1993). Cette technique révèle simultanément un polymorphisme de sites de restriction (double digestion enzymatique de l'ADN) et un polymorphisme de sites d'hybridation d'amorces. La technique d'AFLP génère

un grand nombre (50 à 100) de marqueurs en une seule réaction. Elle se fait en cinq étapes principales (Figure III.1) : digestion de l'ADN génomique, ligation d'adaptateurs, pré-amplification ou amplification pré-sélective, marquage au ³³P et amplification. L'annexe 1 donne le détail du protocole.

Les produits d'amplification sont soumis à une séparation électrophorétique sur gel d'acrylamide. L'annexe 2 montre les opérations de cette électrophorèse. Après migration, le gel est mis à sécher puis mis en contact avec un film autoradiographique (Amersham), dans une cassette hermétique, pendant plusieurs jours.

Après révélation de l'autoradiographie, les bandes AFLP générées sont lues à l'aide d'une table lumineuse et codées indépendamment par deux personnes. Les données sont ensuite comparées de manière à corriger les éventuelles erreurs de lecture des bandes.

II.2 Préparation des ARN totaux

II.2.1 Matériel végétal

II.2.1.1 Echantillonnage

Sauf précision, tous les échantillons d'ARN totaux utilisés sont extraits de plantes issues de graines. Ces dernières, pour une variété donnée, ont été récoltées sur un même arbre à La Réunion (voir seconde analyse AFLP § II.1.1), arbre uniquement entouré de plants de sa variété. On considère ainsi que les graines ont été obtenues en autofécondation même si l'arabica n'est pas un autogame strict. Elles ont été mises à germer à l'obscurité dans un substrat à base de vermiculite. A l'émergence de l'hypocotyle, (un mois plus tard), les plantes ont été transférées dans du terreau, puis placées en serres (IRD à Montpellier), toutes dans les mêmes conditions environnementales (26°C le jour et 22°C, la nuit à 80% d'humidité).

De mars à juillet 2004, neuf prélèvements de cinq plantes de chaque variété ont été effectués tous les 15 jours environ. A chaque prélèvement, les plants ont été rincés à l'eau distillée, puis séchés, rapidement et délicatement. Une fois leurs paramètres de croissance mesurés (taille des feuilles, hauteur globale), ils sont découpés le plus rapidement possible en trois pools d'organes (partie aérienne au dessus de l'hypocotyle, hypocotyle et racines). Ceux-ci ont ensuite été pesés, puis congelés dans l'azote liquide. Les tubes étiquetés ont été alors stockés à -80°C. Cet échantillonnage à des temps croissants (cinétique) de développement permet de stocker le matériel végétal pour d'une part, (i) élaborer les banques soustraites et d'autre part (ii) étudier ultérieurement la cinétique de l'expression différentielle de gènes, au niveau des

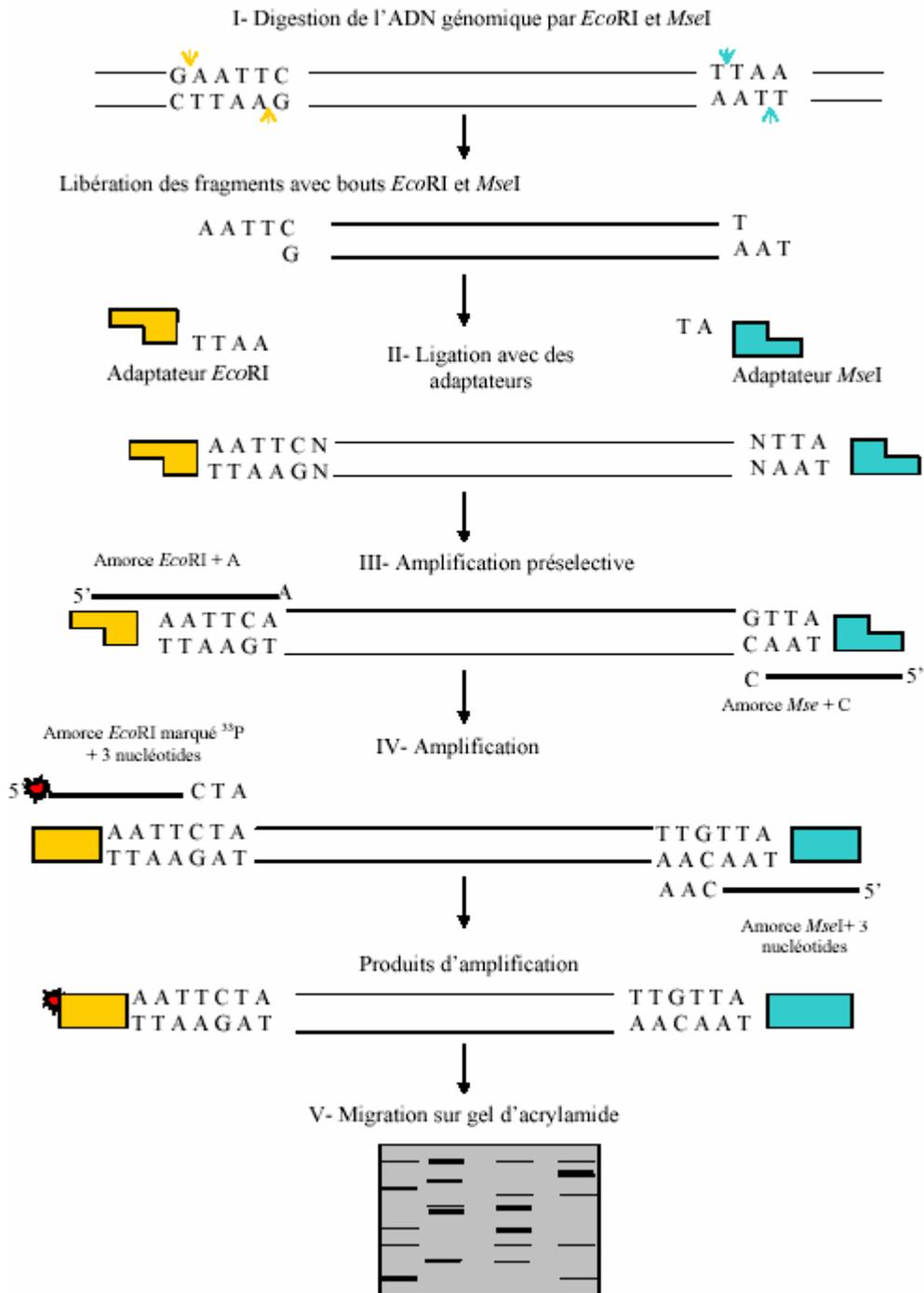


Figure III.1 : Les cinq étapes de la technique AFLP. Cette technique permet de révéler un polymorphisme de site de restriction et d'hybridation des bases arbitraires. Contrairement à la technique d'AFLP génomique, la première amplification (la pré-amplification) n'est pas sélective (amorces sans extension) et l'amplification sélective est obtenue par des amorces portant une extension de deux, et non pas de trois bases.

différents organes, spécifiques à Bourbon ou au Bourbon pointu. En parallèle, des photos et des observations morphologiques - liées à l'évolution de la croissance et de l'architecture - des deux phénotypes sont effectuées tout au long du développement des plantules.

II.2.1.2 Précautions à prendre

Contrairement aux ADN, les ARN sont très labiles et particulièrement sensibles à l'action des ribonucléases. Ainsi toutes les manipulations s'effectuent avec des gants et le plus souvent avec du matériel à usage unique. La verrerie, les mortiers et les spatules sont stérilisés à sec toute une nuit à 150°C au four Pasteur. Toutes les solutions sont préparées avec de l'eau stérile traitée au diéthyl pyrocarbonate (eau DEPC) et autoclavées à 120°C pendant vingt minutes.

II.2.2 Extraction des ARN totaux

II.2.2.1 Méthode

Cinq grammes de feuilles sont broyées au mortier sous azote liquide, puis au broyeur électrique (marque Ika-Werke) (Figure III.2). La poudre fine obtenue est alors mise en suspension dans un tampon d'extraction «Tex » (Annexe 3), et l'ensemble est homogénéisé une minute à l'ultraturax avant d'être laissé sous agitation durant 30 min dans de la glace. Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation et la totalité du surnageant est déposé sur un coussin de 8 ml de chlorure de césium (Annexe 3). L'extrait est alors centrifugé à 120.000 g, pendant 20 heures, à 18°C. Le culot d'ARN est lavé à l'éthanol 70%, suspendu de nouveau dans de l'eau DEPC. Les protéines sont éliminées par au moins deux extractions successives au phénol-chloroforme alcool isoamylique (25 :24 :1) (PCI), puis au chloroforme. Les ARN sont précipités à l'éthanol-acétate toute une nuit à -20°C, puis collectés par centrifugation. Le culot est rincé à l'éthanol, séché, puis repris dans de l'eau DEPC. L'échantillon peut ainsi être conservé à -80°C pendant quelques mois. Pour le plus long terme, les ARN sont précipités à nouveau à l'éthanol-acétate et stockés à -80°C.

II.2.2.2 Quantification des ARN totaux

Une unité d'absorbance à 260 nm équivaut à 40 µg/ml d'ARN. La concentration en ARN est calculée d'après la formule suivante :

$$\text{« Concentration d'ARN (µg/ml) = } DO_{260} \times 40 \times \text{facteur de dilution »}.$$

La pureté des ARN est estimée d'après le rapport d'absorbance 260/280. Si ce rapport est compris entre 1,7 et 2,0, les acides nucléiques sont considérés comme propres.

La qualité des ARN est vérifiée sur gel d'agarose 1,2% dans du TAE 1X. Après une migration de 20min à 100V et une révélation dans une solution de BET (0,5 µg/ml), l'absence de dégradation des ARN est vérifiée sous UV (bandes nettes des ARN ribosomiaux 18S et 28S).

II.3 Construction de banque soustractive.

L'Hybridation Soustractive Suppressive (Diatchenko *et al.*, 1996) combine des étapes classiques de biologie moléculaire dans le but d'identifier des gènes dont l'expression est modulée lors d'un traitement. Selon les auteurs, elle permet un enrichissement de l'ordre de 1000 fois des séquences faiblement exprimées. En effet, grâce à une étape d'amplification PCR, elle normalise la population d'ADNc afin de pouvoir avoir accès aux gènes les moins fréquents. Une étape d'hybridation entre les ADNc issus de deux traitements (ADNc « Tester » et « Driver ») enrichit la banque correspondante en messagers dont l'abondance est modifiée par le traitement ou dans un phénotype particulier. L'annexe 4 et la figure III.3 présentent plus en détail les étapes du protocole.

Cette technique a deux avantages : d'une part, elle est sans *a priori* et donne ainsi accès à des gènes inconnus ou non annotés, et d'autre part, elle nécessite peu de ressources en ARN (quelques µg), facilitant ainsi sa mise en oeuvre quel que soit le végétal considéré.

Cependant, la technique SSh utilisée a deux défauts majeurs : elle débute par une digestion des ADNc par une enzyme de restriction, afin d'obtenir des fragments d'ADN statistiquement inférieur à 500 paires de base environ, ce qui facilite la suite des opérations (amplification, soustraction, suppression). Il en résulte que la plupart des ADNc sont fractionnés en deux ou plusieurs fragments, ce qui rend plus compliqué l'interprétation statistique (bioinformatique) des résultats de séquençage (singletons, contigs, etc.).

Deux banques soustraites ont été construites dans le cadre de la recherche de gènes différentiellement exprimés : « la SSHbp » qui contient des gènes préférentiellement exprimés chez la variété Bourbon pointu par rapport au Bourbon et sa banque reverse « la SSHb ». Les ARN utilisés pour la construction de ces banques proviennent ici de prélèvements sur des plantules âgés de quatre mois (dit du « stade 2 » car second prélèvement) après mise en germination. Elles possédaient alors leurs cotylédons et une paire de très jeunes feuilles, morphologiquement déjà très différentes entre les deux variétés étudiées (annexe 8).

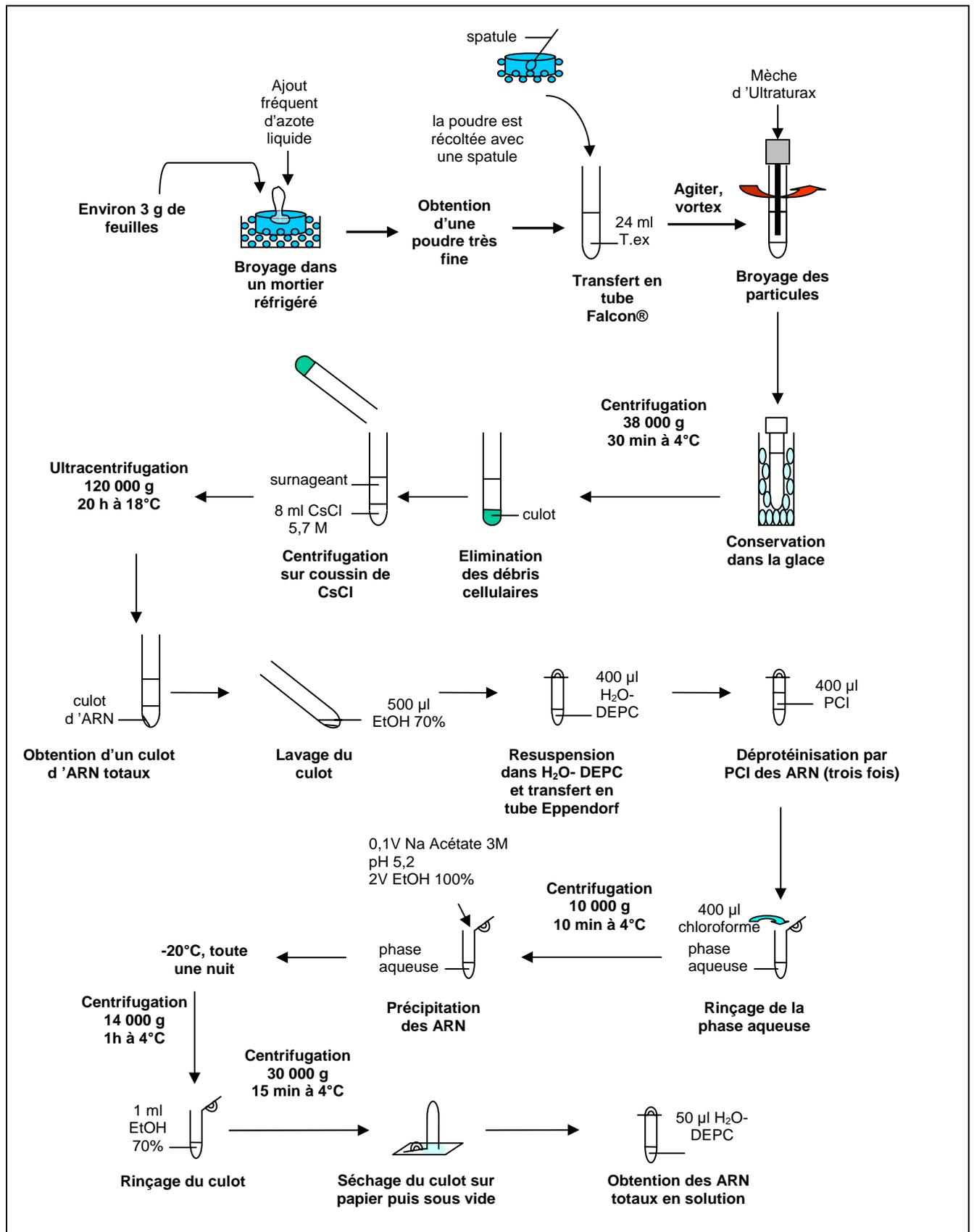


Figure III.2 : Protocole d'extraction des ARN totaux par centrifugation sur coussin de chlorure de césium

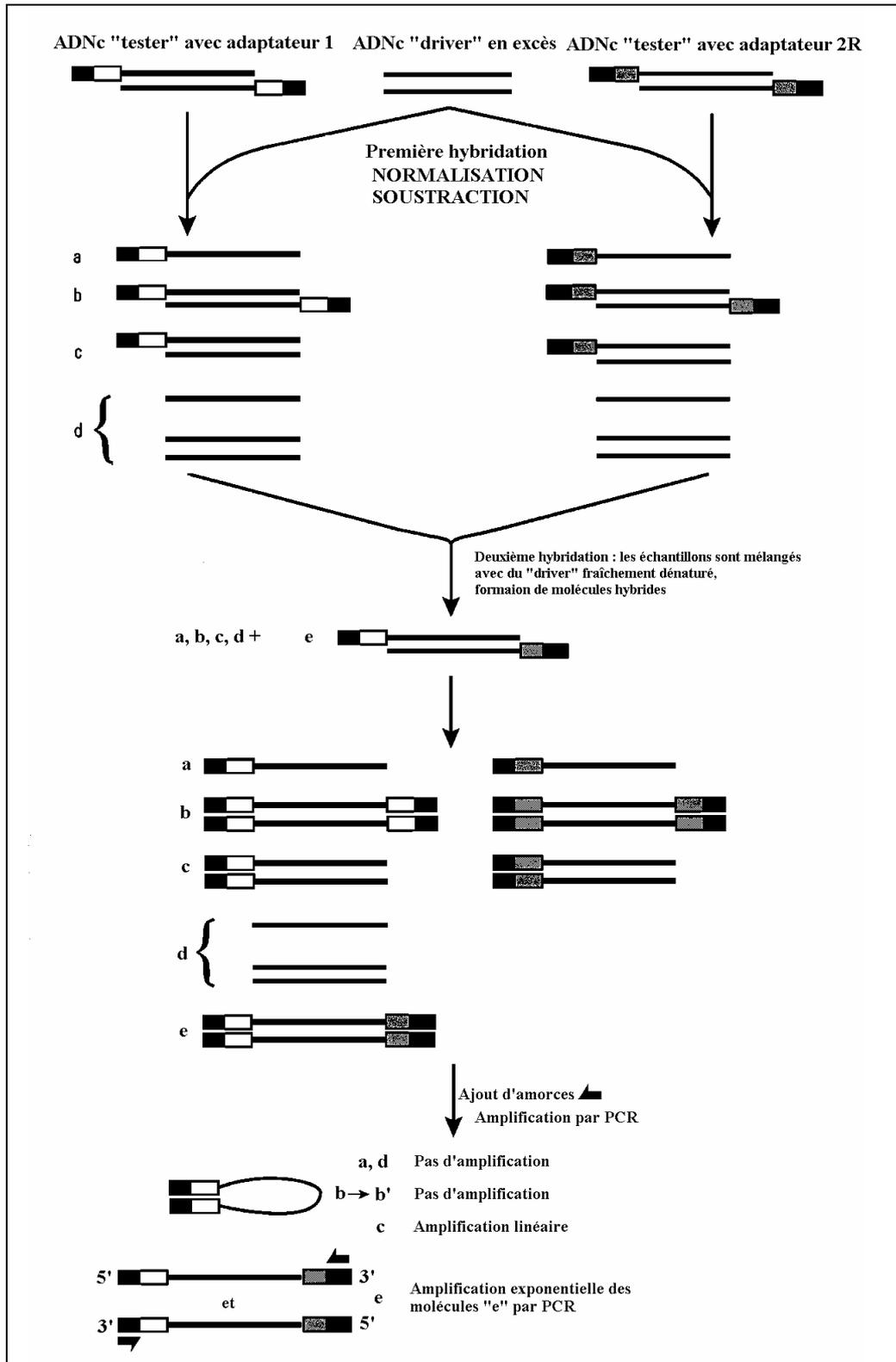


Figure III.3 : Principales étapes de la construction d'une banque soustraite type SSH suivant le protocole du kit « PCR-select cDNA Substraction » de Clontech.

Les molécules « e » correspondent aux ADNc exprimés différemment. Seules ces dernières ayant deux adaptateurs différents pourront être amplifiées exponentiellement lors des deux PCR successives qui terminent le protocole

II.4 Clonage des séquences d'intérêt

II.4.1 Ligation et transformation bactérienne

Le kit « pGEM^R-T Easy Vector Systems » (Promega) a été utilisé pour une insertion dans le vecteur pGEM^R-T Easy (qui porte un site de restriction EcoR1 de part et d'autre du site d'insertion) et la transformation par choc thermique dans des cellules compétentes « JM 109 » d'*Escherichia coli*.

Pour résumer, les produits d'amplification PCR ont, sous l'action de la Taq polymérase, leurs extrémités adénylées. Le vecteur pGEM^R-T Easy ouvert (3015 bp) possède quant à lui deux extrémités T. L'association complémentaire A/T permet alors d'insérer le fragment d'ADN amplifié par PCR dans le plasmide grâce à l'action d'une ligase, celle-ci accrochant les doubles brins d'ADN aux sites complémentaires A/T. La ligation doit être effectuée aussi tôt que possible après l'obtention des produits de PCR.

Deux microlitres de ce produit de ligation sont alors délicatement mélangés aux bactéries compétentes, celles-ci étant par la suite incubées 50 secondes à 42°C, avant d'être plongées dans de la glace. Le choc thermique permet en fait l'entrée des plasmides dans les bactéries. Transformées, ces dernières sont alors immédiatement mises en incubation dans 50 ml de milieu de culture régénérant appelé « SOC medium » pendant 1h30.

Avec une spatule d'étalement, 100 µl de culture bactérienne sont étalés sur des boîtes de Pétri à la surface d'un milieu LB agar sélectif contenant de l'ampicilline à 100 µg/ml (le vecteur porte un gène de résistance à l'ampicilline et à la kanamycine), et sur lequel 20 µl de X-Gal à 50 mg/ml avec 100 µl d'IPTG à 100mM ont été étalés. Les boîtes sont mises 12h à l'étuve à 37°C

II.4.2 Sélection et analyse des colonies

La sélection des colonies commence par l'adjonction d'ampicilline sur les boîtes de culture : seules les colonies transformées poussent. Ensuite, l'utilisation du X-Gal permet de réaliser une sélection blanc-bleu : en présence d'un insert, les colonies bactériennes apparaissent blanches. Une fois les colonies blanches isolées sélectionnées, elles sont prélevées avec un cure dent en conditions stériles, puis déposées dans une boîte de Pétri, à la surface d'un milieu agar sélectif contenant de l'ampicilline. Elles sont ensuite mises à l'étuve toute la nuit à 37°C avant un stockage à moyen terme à 4°C. Le cure dent est quant à lui

plongé dans un tube de culture contenant 3ml de LB liquide et d'ampicilline à 100 µg/ml et mis dans un incubateur sous agitation, à 37°C durant 12h.

II.4.3 Extraction et purification des plasmides

Deux protocoles différents ont été utilisés. L'un avec la méthode de lyse alcaline selon le protocole Maniatis (Sambrook *et al.*, 1989) et l'autre avec le kit Qiagen « plasmid Mini Kit ». Ce dernier protocole se base aussi sur une lyse alcaline classique. Il utilise ensuite des colonnes pour récupérer et purifier davantage de plasmides, mais ne permet pas de bien les concentrer, sans une précipitation ultérieure.

L'estimation de la quantité de plasmides se fait par spectrophotométrie selon la même méthode que pour le dosage des ARN. Une unité d'absorbance à 260 nm équivaut à 50 µg/ml d'ADN plasmidique. La qualité et la taille des inserts sont vérifiées sur gel d'agarose après digestion par *EcoRI*.

II.4.4 Séquençage

Pour le séquençage de quelques plasmides isolés, après précipitation et séchage, 2µg d'ADN sont envoyés à séquencer chez MWG-BIOTECH (Allemagne).

Pour le séquençage d'ESTs de nos banques SSH, après vérification sur quelques plasmides isolés que le séquençage est possible, dix microlitres de produit de ligation de chaque banque ont été directement envoyés chez le même prestataire, qui effectue toutes les manipulations en vue du séquençage du nombre d'ESTs demandé. Plus de 1000 ESTs ont été séquencés à partir de chacune de nos banques. Le séquençage se fait sur un seul brin à partir d'une amorce T7 dont le site de reconnaissance est présent dans le plasmide.

Les clones bactériens issus des banques SSH, dont les plasmides ont été séquencés (ESTs), nous ont été restitués en plaque 384 puits. Ces bactéries sont conservées dans un milieu de culture glycérolé (LB agar sélectif à 100 µg/ml d'ampicilline, glycérol 10 % v/v) à - 80°C.

II.5 *Analyses bioinformatiques des séquences et classement*

II.5.1 Traitement bioinformatique

Le résultat du séquençage d'ESTs a été envoyé par MWG-BIOTECH sous forme de chromatogrammes. Ces derniers ont été directement analysés par le logiciel ESTdb développé à l'IRD de Montpellier (<http://bioinfo.mpl.ird.fr>). ESTdb est un ensemble de procédures

analytiques qui vérifient, nettoient, stockent et analysent automatiquement les ESTs. Ce logiciel a trois composants majeurs : 1) le développement d'un « pipeline » (programme d'analyse de flux de données) dont l'écriture se base sur les logiciels publics existants, mais qui a été écrit et repensé dans le laboratoire, 2) le stockage des résultats et leurs informations, et 3) une interface internet.

Une fonction a été assignée aux EST par homologie de séquences protéiques présentes dans la banque de données GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), par le biais de BLASTx (Basic Local Alignment Search Tools ; Altschul et al. 1997) développé sur l'interface internet de NCBI (National Center for Biotechnology Information) (<http://www.ncbi.org>). Les unigènes potentiels (les contigs - Ensemble de fragments d'ADN contigus et ordonnés – et les « singleton » -gènes uniques-) ont été identifiés grâce à ce logiciel.

II.5.2 Classement des séquences

Un classement préliminaire, basé directement sur les résultats bruts sans tenir compte de la fonction (potentielle) des séquences codées, permet une analyse « structurelle » des banques. Cinq classes sont ainsi déterminées : 1) Protéines de fonction connue, 2) protéines dont la fonction est putative ou probable, 3) protéines dites « exprimées » ou « hypothétiques », 4) fonction inconnue, 5) « no hit » (aucune homologie de séquence trouvée).

A partir de ce classement préliminaire, une analyse plus approfondie ne prend en compte que les séquences de fonctions "connues, putatives et probables" (groupes 1 et 2 précédents). Neuf catégories différentes de fonction ont été définies d'après des systèmes de classements existants, tels celle de MIPS (*Munich Information center for Protein Sequences*), EGAD (*the Expressed Gene Anatomy Database*) ou EMBL-EBI (*European Bioinformatics Institute*) :

- Métabolisme primaire, avec comme sous-classes : carbohydrates, lipides, acides aminés et « autres » (cofacteurs, nucléotide...);
- Métabolisme secondaire, (composés phénoliques, etc.) ;
- Transduction du signal (passage des informations, transmission des signaux...);
- Transport ;
- Photosynthèse ;
- Respiration ;

- Survie des cellules, défense et stress (gènes répondant aux stress, gènes de défense,...) ;
- Organisation cellulaire (paroi cellulaire, cytosquelette, actine, ...) ;
- Protéine et gène avec comme sous-classes :
 - Expression (transcription, traduction, croissance & développement, etc...),
 - Régulation (phosphatase...),
 - Catabolisme des protéines (ubiquitine, kinase...),
 - Maturation des protéines (chaperones...).

II.6 Elaboration des filtres à ADN de moyenne densité (macro-arrays)

Les sondes déposées sur des filtres de Nylon sont générées par PCR à partir d'ADNc. Etant issues de nos deux banques SSH, clonés dans les plasmides (pGEM® –T easy de Promega), les extrémités des inserts (sondes) sont flanquées respectivement des sites d'amorçage pour des amorces PCR spécifiques : NP1 et NP2R.

II.6.1 Préparation des sondes

Les sondes déposées correspondent aux inserts de l'ensemble des clones d'ADNc provenant de nos deux banques SSHbp et SSHb, dont les plasmides ont subi un séquençage EST. Sur l'ensemble de ces deux banques 2304 ESTs ont été séquencés. Le même nombre de sondes a donc été généré.

II.6.1.1 Amplification des sondes à partir des clones bactériens

Pour chaque clone, quatre amplifications PCR sont effectuées pour obtenir assez d'ADN à déposer sur une cinquantaine filtres. L'amplification des inserts des clones bactériens est réalisée avec les amorces utilisées pour la construction des banques soustraites (nested primer 1 ou NP1 : 5'- TCGAGCGGCCCGCCCGGCAGGT-3'et nested primer 2 ou NP2R : 5'-AGCGTGGTCGCGGCCGAGGT-3').

Pour une PCR, le mélange comprend 2µl de solution bactérienne non diluée, 20µl de tampon 5X, 2µl de dNTP à 5mM, 2µl de chaque amorce NP1 et NP2R à 10µM. Il est complété à 100 µl avec de l'eau stérile. Au dernier moment, 0,5µl de taq polymérase (4U /µl) est ajouté au mélange

Les échantillons sont d'abord dénaturés à 94°C pendant 5 min avant de poursuivre 40 cycles comprenant 30 secondes à 94°C, 1 min à 68°C et 1 min 30 à 72°C. Pour finir, une extension finale a lieu pendant 10 min à 72°C.

II.6.1.2 Précipitation de l'ADN et dosage

Pour chaque sonde, les quatre réactions PCR sont ensuite rassemblées (soit 400 µl) et les produits d'amplification précipités à l'acétate de sodium 3 M pH 5.2 (1 /10 : v /v) dans 760 µl d'éthanol absolu, pendant une nuit à - 20°C.

Après centrifugation (2h, 20.000g, 4°C), les culots d'ADN sont lavés à l'éthanol 70%, puis à nouveau centrifugés pendant une heure dans les mêmes conditions. Le surnageant est éliminé et le culot séché à l'air libre, au minimum pendant au moins deux heures, puis resuspendu dans 25 µl d'eau stérile pendant une nuit sur table d'agitation à environ 200 rpm. Ce matériel est stockés à -20°C.

Un aliquot de chaque pool de produits PCR est déposé sur gel d'agarose (2 %) afin de vérifier leur qualité et d'estimer la concentration des amplicons. Les résultats obtenus (amplification satisfaisante, pas d'amplification, profil double bande ou amplicon de trop faible concentration) sont répertoriés sous Excel (Figure III.4).

II.6.2 Définition de l'organisation des filtres

Les produits d'amplification (initialement 24 plaques de 96 puits) sont réorganisés en six plaques de 384 puits (trois pour BR et trois pour BP) pour l'étape de dépôt sur les filtres. Quatre plaques d'amplification PCR servent à la construction de chaque filtre : trois plaques de produits d'amplification correspondant à l'une des deux banques (SSHbp ou SSHb) et une plaque regroupant les témoins ; soit au final environ 1500 dépôts/filtre. Au total, environ 50 filtres ont été réalisés par banque soustraite.

Essentiellement pour des raisons techniques liées au robot, les produits d'amplification de chacune des deux banques ont été regroupés sur deux filtres distincts.

Par souci de simplification et pour conserver les coordonnées des clones sur les plaques et sur les filtres, l'ensemble des produits d'amplification a été déposé selon un motif présenté figure III.5. Ils sont déposés en un seul exemplaire sur les filtres.

Des séquences « témoins » sont répétées au minimum en deux exemplaires à différents endroits sur le filtre afin de vérifier la variabilité inter- et intra-filtre lors des hybridations. Ces séquences témoins correspondent :

- Soit à des gènes dont l'expression est supposée constitutive : l'actine, l'ubiquitine, les protéasomes, les facteurs d'élongation, une séquence ribosomale, la tubuline; ou d'autres séquences tel un oligonucléotide poly A, de l'ADN génomique. Quatre dilutions des trois

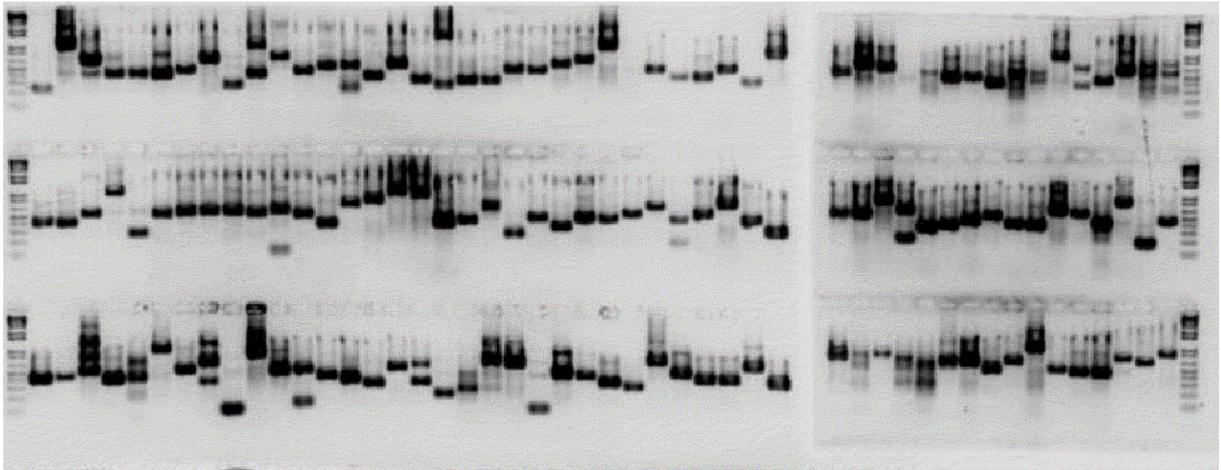


Figure III.4 : Electrophorèse des produits PCR sur gel d'agarose



Figure III.5 : Organisation des filtres à partir d'un motif en quatre (à gauche) et motif en cinq (à droite) lors de l'analyse des hybridations avec l'emplacement en noir du bruit de fond (BdF). Un motif regroupe l'ensemble des quatre produits d'amplification de même coordonnée pour les quatre plaques 384.

L'exemple est ici donné pour le premier motif, situé en haut à gauche du filtre, qui rassemble les quatre produits d'amplification situés en coordonnée A1 sur les quatre plaques 384 (I à III et la plaque témoin).

premiers témoins sont déposées une fois sur le filtre. La solution-mère C0 a été diluée de moitié afin d'obtenir la solution C1, à partir de laquelle la solution C2 a été obtenue (dilution 1/2). Cette dernière a servi de solution-mère à la solution C3 (dilution 1/4) (Tableau II.1) .

- Soit, pour la plupart, à des séquences d'ADN normalement absentes, ou non exprimées, chez les caféiers. Il s'agit du gène rapporteur « Green Fluorescent Protein » (GFP), du vecteur de clonage 5sfz+ (Promega), ainsi que du vecteur pGEM-T easy (Promega) sous sa forme circulaire (vecteur utilisé pour le clonage des banques soustraites), et d'un oligonucléotide poly T). Le dernier témoin est constitué d'eau bidistillée stérile. (Tableau III.1)

II.6.3 Dépôt automatisé des sondes sur les filtres

Le dépôt des ADNc sur les filtres de Nylon Hybond N+ (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, Angleterre) (7.8cm*11.9cm) a été réalisé au CIRAD grâce à la collaboration de M. Xavier Sabau (CIRAD, UMR PIA) et à l'aide du robot FLEXYS (Genomic solutions) de la plateforme robotique Génopole Montpellier Languedoc Roussillon. Pour chaque sonde, quatre dépôts successifs sont nécessaires pour transférer environ 20 ng de produit PCR sur le filtre. A la fin du dépôt, les filtres sont incubés successivement pendant 10min, dans trois bains :

- un de dénaturation (NaOH 0.5 M) ;
- un de neutralisation (1.5 M de NaCl, 0.5 M Tris pH 7.5 et 1 mM EDTA) ;
- et un de rinçage (2xSSC).

Après une nuit de séchage à température ambiante, sur du papier Whatman n°3, les ADNc sont fixés de façon covalente aux filtres grâce à une exposition sous ultraviolets (UV Linker Spectronics Corporation modèle XL 1000) pendant une minute, à puissance maximale (*100µjoules/cm²).

II.6.4 Fabrication des cibles complexes à partir des ARNm totaux

Les cibles complexes marquées au [α^{33} P] sont générées par rétro-transcription à partir d'ARN totaux avec le kit LabelStar (Quiagen). Les ARN sont issus de prélèvements sur des plantules âgées de cinq mois après mise en germination (Stade 4, Annexe 8). Dix microgrammes d'ARN totaux dénaturés (5 min à 95°C, et 5 min dans la glace) sont mélangés avec 5 µl de [α^{33} P] dCTP (300Ci/mmol) et aux réactifs de transcription inverse : 5 µl de tampon Buffer RT 10X, 5 µl de dNTP non radioactif (dATP, dGTP, dTTP à 20 mM ; et dCTP à 0.2 mM), 5 µl d'amorces oligo-dT (20 µM), 0.5 µl d'inhibiteur de Rnase (40 units/µl) et 2.5 µl de

Tableau III.1 : Liste des clones retenus comme sondes pour la construction des *macro-arrays*

Nombres de clones issus de la Banque SSHbp ou SSHb		BP	B
		1152	1152
Témoins négatifs	GFP	3	2
	5SFZ+	2	2
	pGEM-T easy	2	3
	ADNg	3	4
	eau	2	2
	queue poly A	4	5
	queue poly T	4	4
	Sous-total	20	22
Témoins positifs	actine	2	3
	actine diluée	5	5
	ubiquitine	2	3
	ubiquitine diluée	5	5
	Protéasome (AAA-ATPase subunit)	2	3
	protéasome dilué	5	5
	elongation factor	4	4
	tubuline	4	4
	ribosome	3	4
	Sous-total	32	36
Total Témoins		52	58
Total des clones		1204	1210

LabelStar Reverse Transcriptase. Puis, le volume du mélange est ajusté à 50 µl avec de l'eau « Rnase free » et l'ensemble est mis à incuber une heure à 37°C. A partir d'un stock d'ARN donné, quatre RT indépendantes sont réalisées et serviront à hybrider quatre lots de filtres différents.

II.6.5 Conditions d'hybridations, révélation du signal et acquisition des images

Pour chaque pool d'ARN de départ, quatre répétitions de RT ont été réalisées et chacune a été hybridée sur deux filtres (un de chaque banque SSH). Seize filtres servent ainsi à comparer nos deux variétés dans une condition donnée : huit filtres sont hybridées avec les ADNc cibles issus d'ARN issus de Bourbon, et huit, hybridées avec ceux de Bourbon pointu.

Un filtre de chaque banque (SSHbp et SSHb) est placé dans des tubes d'hybridation. Les paires de filtres ainsi constituées sont mises à pré-hybridier dans 30 ml de tampon (7,5 ml de SSC 20X, 3 ml de Denhart 50X, 0,9 ml de SDS 20%, et 120 µl d'ADN de sperme de Hareng dénaturés à 10 mg/ml ; auquel 18,48 ml d'eau sont ajoutés) pendant au minimum 6h, à 65°C, dans un four rotatif.

Après dénaturation (5 min, 95°C), 50 µl de chaque cible sont ajoutés au tampon de pré-hybridation et les filtres sont mis à incuber pendant une nuit à 65 °C. Le lendemain, la filtre subit trois lavages successifs à 65°C non stringents (SSC 1X, SDS 0.1%) de 20 min chacun, suivi d'un quatrième lavage plus stringent (SDS 0.1%, SSC 0.1X) de 15 min.

Enfin, le filtre est scellé dans du film Cellophane Saran et mise en contact avec l'écran Kodak « Storage Phosphor Screen » (Amersham Biosciences) pendant au minimum quatre jours. Après avoir scanné l'écran au phosphoimager Typhoon 9210 (Amersham Biosciences), (Pixel : 50 µm et meilleure sensibilité) l'image est analysée grâce au logiciel ArrayVision 8.0 (Imaging Research, Ontario-Canada).

Une grille de mesure est ajustée à la matrice des sondes disposées sur le filtre. Ceci permet de mesurer les signaux d'hybridation de façon reproductible. Les zones de mesure définissant la grille sont circulaires et centrées sur chaque dépôt. Elles entourent la totalité du signal d'hybridation. Le logiciel intègre le signal de chaque sonde (codé en pixels), puis exporte l'ensemble des données dans un tableau Excel.

II.7 Analyse des données issues des hybridations macro-arrays

II.7.1 Vérification de la soustraction de banques

Dans un premier temps, afin de confirmer l'efficacité de la soustraction des banques et de ce fait leur utilité dans cette étude, une hybridation a été effectuée avec les deux populations d'ADNc soustraits ayant servies à la construction des banques SSHbp et SSHb.

II.7.2 Reproductibilité entre les filtres

Pour tester la reproductibilité du dépôt d'un filtre à l'autre, une série d'hybridations a été réalisée avec trois filtres indépendants incubés avec la même cible complexe synthétisée par une seule réaction de Rétro-Transcription (RT).

II.7.3 Analyse du bruit de fond

Le signal « bruit de fond » est mesuré sur des zones du filtre vierges de dépôt ADN. La valeur du bruit de fond est définie au centre de chaque motif et est propre aux quatre ESTs formant le motif.

L'analyse du bruit de fond a trois objectifs :

- éliminer les points aberrants (valeurs anormalement élevées assimilées des traces de radioactivité aspécifiquement fixées sur les filtres) ;
- déterminer la transformation de variable permettant l'utilisation de l'analyse de la variance. Dans notre cas, cette transformation s'avera être de type logarithmique ;
- tester la présence éventuelle d'un impact du type de sonde (« pointu » ou « rond ») et de type filtre (quatre modalités, hiérarchisé au premier facteur) sur le bruit de fond. Un modèle hiérarchisé, équilibré et mixte d'analyse de la variance (ANOVA) a permis cette vérification.

Un échantillon aléatoire de 100 bruits de fond a été constitué pour cette analyse du bruit de fond.

II.7.4 Analyse des témoins négatifs et positifs

II.7.4.1 Indépendance entre bruit de fond et signal

Pour corriger le signal brut, il est nécessaire de vérifier l'absence théorique de relation entre ce dernier et le bruit de fond. Cette vérification a été réalisée sur l'ensemble des témoins, négatifs et positifs. En pratique, la présence d'une relation a effectivement été mise

en évidence et un ajustement a été réalisé par la méthode des moindres carrés non linéaires. La validation du modèle avec la vérification de l'homoscédasticité et l'absence de relation entre résidus est faite à partir des graphes de résidus en fonction des valeurs attendues. Cette validation permet aussi l'élimination des points aberrants.

Par la suite, la transformation des données permettant d'éliminer la relation entre le bruit de fond et la valeur du signal a été recherchée. Il a ensuite été vérifié que cette correction supprimait aussi la variabilité existant entre filtres. Une analyse de variance d'un modèle hiérarchisé, équilibré et mixte (facteur « sonde » et « filtre ») a été utilisée pour cela.

II.7.4.2 Analyse des témoins négatifs

Les signaux corrigés des témoins négatifs ne doivent pas présenter de différences entre témoins négatifs, mais aussi entre les deux types de sonde puisque ces témoins ne sont pas sensés s'hybrider à la sonde. L'étude s'est faite avec les filtres de SSHbp, à partir des témoins négatifs suivants : eau, le vecteur vide PGEM, le vecteur vide sfz et les polyT. Deux des répétitions par filtre de ces témoins sont utilisées, répétitions qui ne contiennent pas de points aberrants au niveau des bruits de fond. Un modèle croisé équilibré à deux facteurs d'analyse de variance a été utilisé : le facteur « sonde » à deux modalités « pointu » et « rond » et le facteur « type de témoin » à quatre modalités. L'analyse de la droite de Henry et le graphe des résidus en fonction des valeurs attendues est utilisée pour supprimer les points aberrants.

II.7.4.3 Analyse des témoins positifs

Les témoins positifs ont été théoriquement choisis pour ne pas présenter de différentiel d'expression entre les Bourbon et Bourbon pointu. Il est nécessaire de vérifier ce choix sur les signaux corrigés. Chaque témoin est représenté par une gamme de dilution. La solution mère C0 est associée à la valeur de dilution 1. Les solutions C1, C2 et C3 ont ainsi respectivement les valeurs de dilution 0,5 ; 0.250 et 0.125. Un modèle croisé à deux facteurs d'analyse de variance est utilisé pour étudier les signaux corrigés de l'actine et de l'ubiquitine pour chacun des filtres SSHbp ou SSHb : le facteur « sonde » à deux modalités « pointu » et « rond » et le facteur « dilution » à quatre modalités. On ajoute à chaque analyse les signaux obtenus à partir des dépôts d'eau, considérés comme ayant une valeur nulle de dilution. Le test de Tukey (« Honestly Significant Difference ») est ensuite utilisé pour classer les moyennes lorsque l'effet est significatif. La relation entre les signaux bruts corrigés et la valeur de dilution a été ajustée par la technique des moindres carrés non linéaires. La validation du modèle avec la

vérification de l'homoscédasticité et l'absence de relation entre résidus est faite à partir des graphes de résidus en fonction des valeurs attendues.

II.7.4.4 Recherche des sources de variations liées à la technique des *macro-arrays*

Pour améliorer la puissance du test statistique il est nécessaire de vérifier la présence de sources de variations liées à la technique pour soit les contrôler (comme par exemple avec les traditionnels effets Blocs, ou l'analyse de la covariance), soit les éliminer par une correction sur la variable (centrage).

La première source de variation susceptible d'être générée concerne l'utilisation de deux filtres. En effet, dans le même tube d'hybridation se trouvaient un filtre de type SSHb et un filtre de type SSHbp, sur lesquels étaient déposés les mêmes types de témoins. Les filtres ont donc subi par paire exactement les mêmes caractéristiques d'hybridation (même sonde issue de la même RT et du même marquage, mêmes lavages...). Les témoins déposés sur les deux filtres de chaque paire se différencient uniquement par leur réalisation (même solution mère de départ mais dépôt, fixation et séchage différents) qui, de plus, s'est fait à un jour de décalage. La présence d'une variabilité entre les deux filtres a été testée en utilisant un modèle fixe et équilibré d'analyse de la variance à un facteur « type de filtre » avec deux modalités.

D'autres facteurs peuvent être source de variation dans les expérimentations et en particulier le marquage des ARNm par rétrotranscription et l'incorporation de phosphore radioactif. Afin de tester cet effet, que nous appelons « effet RT », un modèle croisé à deux facteurs d'analyse de variance a été utilisé. Le second facteur est le facteur « Témoin » avec trois modalités : l'actine, l'ubiquitine et un facteur d'élongation.

Lorsqu'un facteur de variation est identifié, une correction est apportée aux données. De nouvelles analyses de variance basées sur les mêmes modèles que précédemment et avec les mêmes témoins sont utilisées pour tester si l'effet disparaît ou alors devient moins important (diminution du carré moyen résiduel de l'analyse).

II.7.5 Mise en évidence des différences d'expression entre Bourbon et Bourbon pointu

Les valeurs brutes d'intensité d'hybridation des clones ESTs sont d'abord corrigées du bruit de fond et des autres facteurs de variation en suivant la méthodologie mise au point précédemment. On obtient alors des valeurs corrigées pour chacune des huit valeurs d'une EST donnée, valeurs qui servent aux analyses.

Pour chaque ESTs, un ratio « BP/BR » entre les deux variétés est calculé à partir des moyennes des valeurs corrigées. Quand ce ratio est supérieur à un, l'EST a une valeur d'hybridation plus forte chez le Bourbon pointu, et dans le cas contraire elle est plus forte chez le Bourbon.

Chaque type de filtre est analysé indépendamment.

Les analyses de variance sont appliquées sur des lots constitués de 100 EST. Ces lots ont été échantillonnés de manière aléatoire sur l'ensemble des EST. Cinq témoins négatifs sont ajoutés à chaque lot. Deux types de comparaisons sont appliqués aux valeurs :

- Comparaison par rapport aux témoins négatifs. On sélectionne ainsi les ESTs montrant une expression significativement différente de zéro. Pour chaque type de sonde, une analyse de variance utilisant un modèle à un facteur fixe (« nom de l'EST ») et un test de Dunnett sont utilisés. Les points aberrants sont retirés en analysant la droite de Henry sur les résidus. Les résultats de ces deux analyses de variance (une par sonde) sont ensuite regroupés et quatre classes sont constituées (Tableau III.2). La classe 1 regroupe les EST dont le signal ne diffère pas de celui du bruit de fond. La classe 2 (respectivement 3) est composée des EST dont le signal ne diffère de celui du bruit de fond qu'avec les sondes de type B (respectivement type BP). Les ESTs intéressants sont ceux des classes 2 (exprimés dans Bourbon) et 3 (exprimés chez Bourbon pointu). Pour limiter le risque de faux-positifs, les EST ne sont prises en considération que lorsque la probabilité issue du test de Dunnett est à la fois inférieure à 0,0005 pour un « Oui » et supérieure à 0,50 pour un « Non ».

- Pour les ESTs se révélant différentes des témoins négatifs à la fois pour les sondes de type rond ou pointu (classe 4), une analyse de variance avec un modèle croisé fixe à deux facteurs a été utilisée : les facteurs sont « EST » et « type de sonde ». Le test de la *Least Significant Difference* (LSD) de Fisher avec la correction de Bonferroni a permis ensuite de déterminer quelles ESTs étaient différentiellement exprimées.

II.8 Validation par RT-PCR

II.8.1 Dessin et validation des amorces

Les amorces sont dessinées à l'aide du logiciel « Primer3 » (Rozen et Skaletsky, 2000 ; http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi). Les paramètres appliqués au dessin de ces amorces ont été définis comme suit : une température d'hybridation de 58°C (+/- 2°C), l'absence d'appariement inter- et intra-amorces, une taille de 18 à 25 nucléotides

Tableau III.2 : Classification des ESTs selon leur différence par rapport au signal corrigé des témoins négatifs.

Différent des témoins négatifs avec cible BP	Différent des témoins négatifs avec cible BR	Classe
Non	Non	1
Non	Oui	2
Oui	Non	3
Oui	Oui	4

avec au moins 60% de GC et un amplicon de 200 à 500 pb. Les synthèses ont été réalisées par MWGBiotech (Ebersberg, Germany).

La spécificité du couple d'amorces vis-à-vis de l'EST est vérifiée au travers d'un alignement local de séquence dans nos banques SSHbp et SSHb.

Les couples d'amorces, testés par PCR sur les ADNc, sont écartés lorsqu'il n'y a pas d'amplification ou en présence de doubles bandes. Ensuite, il s'agit d'identifier, pour chaque gène, à partir de combien de cycles d'amplification PCR le produit devenait visible sur gel d'agarose. A partir de ce cycle, cinq prélèvements, distants de trois cycles chacun, sont effectués. Le gène de l'ubiquitine est utilisé comme témoin et a été soumis aux mêmes analyses que les autres gènes candidats. La spécificité des amorces est vérifiée après extraction des produits d'amplification séparés sur gel d'agarose (kit « QIAquick Gel Extraction » de QIAGEN, suivant les recommandations du fabricant) et envoi à MWG Biotech pour séquençage à raison de 20ng d'ADN/100 bases. Ces séquences purifiées servent aussi à la fabrication des sondes Northern.

II.8.2 Traitement des ARN

Après leur extraction, les ARN totaux provenant du même prélèvement ayant servi à faire les cibles des *macro-arrays* (extraits du stade 4, Annexe 8) sont mis en présence de huit unités de DNase RQI « RNase free » (Promega, Madison, WI, USA) à 37°C durant 30min. En fin de réaction le volume est ajusté à 400 µl avec de l'eau DEPC. Les ARN sont alors purifiés (ou déprotéinisés) par extraction au phénol-chloroforme (v/v). Après centrifugation (15 000g, 4°C, 10 min), la phase aqueuse contenant les ARN est traitée au chloroforme-alcool isoamylique, (24/1, v/v). Après une nouvelle centrifugation (15 000g, 4°C, 10 min), les ARN sont précipités (-20°C, 16h) à l'acétate de sodium (3M, [pH 5.2], 1/10 (v/v)) dans trois volumes d'éthanol absolu). Après centrifugation, (20 000g, 4°C, 30 min), les ARN sont rincés à l'éthanol 70°, puis centrifugés à nouveau (20 000g, 4°C, 10 min) avant d'être finalement dissous dans 50 µl d'eau DEPC.

II.8.3 Obtention des ADNc

Pour la rétro-transcription, nous avons utilisé le kit Super Script First Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen). Dans un premier temps, un microgramme d'ARN totaux traités (§ précédent), issus soit de BP, soit de B, sont rétrotranscrits en ADNc, en ajoutant 1 µl de dNTP à 10 mM, 1 µl d'oligodT à 0.5 µg/µl en ajustant le volume final à 10µl avec de l'eau DEPC. Le mélange est alors mis à incuber à 65°C pendant 5 min (dénaturation des ARN),

puis déposé sur glace pendant 1 min. Ensuite, 2µl de RT buffer 10X, 4 µl de MgCl₂ à 25 mM, 2µl de DTT à 0.1 M et 1 µl de Rnase out sont ajoutés. Le mélange est ensuite incubé à 42°C pendant 2 min (synthèse du 1^{er} brin d'ADNc). Après avoir ajouté 1 µl de Superscript II RT Invitrogen (50U/µl), il est remis pendant 50min à la même température (synthèse du second brin). Il est ensuite transféré à 70°C pendant 15 min, puis refroidi sur glace. Après addition d'un microlitre de Rnase H, il est enfin incubé au bain-marie à 37°C pendant 20 min. Ces ADNc (20 µl) sont conservés à -20°C.

II.8.4 Conditions de PCR et quantification du signal

Plusieurs prélèvements à des cycles différents sont effectués pour un même mélange de PCR. Un prélèvement de PCR est composé de 0,5µl d'ADNc dilué au 1/10^{ème} mélangé à 5µl de tampon 5X, 0,5µl de dNTP à 5mM, 0,5µl de chaque amorce à 10µM et une unité de GoTaq. De l'eau stérile est ajoutée pour obtenir un volume final de 25µl. Un mélange global est préparé en multipliant les quantités précédentes par le nombre de prélèvements prévus puis des tubes différents contenant 25µl de ce mélange sont préparés. Un tube représente ainsi un prélèvement.

Tous les échantillons sont ensuite dénaturés à 94°C pendant 5 min avant de poursuivre 22 à 43 cycles selon les gènes. Ces cycles sont composés de 30 secondes à 94°C, 1 min à 58°C et 1 min à 72°C. Les prélèvements sont effectués et placés au fur et à mesure dans la glace. Un dépôt de 15 µl de produit PCR est ensuite effectué sur gel d'agarose 1,5% pour séparation électrophorétique (1h, 100volts). Afin de s'affranchir de biais expérimentaux potentiels, les différentes répétitions des PCR d'une même RT n'ont pas été déposées ni sur le même gel, ni selon le même ordre. Les bandes d'ADN sont visualisées sur une table à UV après trempage dans un bain de Bromure d'Ethidium (BET).

Pour homogénéiser les résultats, les temps d'incubation dans le BET et de rinçage sont identiques pour tous les gels. De même, les bandes sont toujours positionnées sur la table à UV au même endroit. Les photographies sont prises avec une caméra TM-6EX (Pulnix) et numérisées avec le logiciel Perfect Image version 6.1 (Clara Vision). Les fichiers de type Tiff et de résolution 300*300ppm sont ensuite utilisés pour quantifier l'intensité du signal grâce au logiciel « Array-Vision™ v.8.0 » d'Imaging Research Inc. L'acquisition des données se fait par mesure de la fluorescence des dépôts d'ADN au niveau de leur zone centrale. Le bruit de fond est estimé à partir d'une zone vierge la plus proche possible du dépôt.

II.8.5 Validation du différentiel d'expression

Des répétitions sont nécessaires pour valider une différence d'expression entre BP et B. Les RT utilisées sont issues chacune d'expériences indépendantes, mais elles sont regroupées par couple BP/BR, signifiant que les deux RT sont faites en même temps. Pour chaque gène candidat, au minimum quatre couples de RT (BP/B) servent aux analyses, et chacun de ces couples est utilisé pour deux PCR indépendantes (au minimum). Une expérience sur un gène candidat est donc basée sur au moins 80 valeurs : cinq prélèvements x quatre RT x deux répétitions x deux variétés. Ce nombre est revu à la hausse lorsque l'analyse statistique s'avère insuffisamment puissante.

Enfin, les cycles correspondant à la zone de plateau de la PCR, en saturation, ne sont pas pris en compte dans les analyses et il en est de même pour ceux montrant des signaux trop faibles.

Lors de l'analyse de la variance des blocs sont définis. Un bloc correspond à chacune des expériences PCR, donc à un couple de RT et à une répétition de PCR. Ceci permet de rassembler en un seul facteur les effets liés au gel (temps d'incubation dans le BET, temps de rinçage, temps de migration, de concentration du gel) et liés aux RT (dues à la RT, mais aussi aux mélanges de PCR, réalisés indépendamment entre RT). Les analyses d'expression se font à partir des valeurs corrigées du bruit de fond de signaux. L'analyse de la variance (ANOVA) d'un modèle croisé, fixe, à trois facteurs (variété, cycle et bloc), avec uniquement les interactions du premier degré (variété*bloc, variété*cycle, cycle*bloc) est réalisée pour mettre en évidence des différences entre variétés.

Pour chacun des gènes, la relation sigmoïde de type « $Y = M/(1+e^{a(X-b)})$ » entre le signal corrigé et le nombre de cycle est ajustée par la méthode des moindres carrés non linéaires pour vérifier la cinétique attendue de l'amplification et éliminer les points aberrants.

La validation des analyses de la variance ou des régressions (exclusion des points aberrants) est réalisée à partir de l'analyse de la droite de Henry et du graphe des résidus en fonction des valeurs attendues. Les analyses sont répétées jusqu'à l'élimination de tout point aberrant. Les données sont exploitées à l'aide du logiciel « STATISTICA 7.1© » de StatSoft Inc pour Microsoft Windows.

II.9 Validation par Northern

Dans le cas des hybridations de type *Northern*, les cibles sont fixées sur les membranes de nylon et ne sont pas marquées à la radioactivité. En revanche, la sonde, qui correspond au seul gène précis dont l'expression est étudiée, est en solution et marquée radioactivement.

La technique consiste à faire migrer les ARN sur un gel, puis à les transférer et les fixer sur un filtre de nylon (Figure III.6).

II.9.1 Préparation de la membrane

- *Electrophorèse en conditions dénaturantes* : Les ARN (15 µg en solution à 1 µg/µl) sont dénaturés par l'ajout de 20 µl de tampon de charge (formaldéhyde 17%, formamide 49%), puis placés à 65°C pendant 3 min. Cette étape permet leur linéarisation en vue de leur séparation d'après leur taille. L'électrophorèse est réalisée sur un gel d'agarose 1,2 % dénaturant et contenant du BET (Composition annexe 5). La migration est effectuée dans du tampon 1X MOPS. La qualité des ARN est vérifiée par une brève exposition aux ultraviolets : les bandes correspondant aux ARNr 28 S et 18 S doivent être visibles.

- *Transfert sur membrane et visualisation des ARN* : Le transfert sur membrane (Hybond® N, Amersham) se fait par capillarité grâce à un tampon de transfert (6 X SSC). Ce tampon traverse le gel et entraîne les ARN qui sont retenus par la membrane. Le dispositif permet un flux constant et réparti pendant toute une nuit. Après lavage à l'eau DEPC et séchage, les ARN sont fixés à la membrane par les ultraviolets (1200W/cm²). La membrane est lavée à l'acide acétique pendant 15 min et les ARN sont colorés par du bleu de méthylène (0.01 % de bleu dans 0,5M d'acétate de sodium à pH 5,2) pendant 10 min. L'excès de bleu est enlevé par un lavage à l'eau DEPC.

- *Pré-hybridation* : La membrane est placée dans un tube à hybridation en présence de la solution de pré-hybridation (5 X SSC, 5 X Denhardt's, tampon phosphate 20 mM, SDS 6,6 %) à 65°C dans un four rotatif, pendant deux à trois heures afin de saturer la membrane de façon non-spécifique.

II.9.2 Marquage de la sonde – Hybridation

L'ADN complémentaire de l'insert correspondant au gène étudié est synthétisé en présence de $\alpha^{32}\text{P}$ -dATP (50 µCi) par la technique de l'amorçage aléatoire (random priming) à l'aide du kit « Megaprime™ DNA labelling system Amersham ». La sonde marquée est ajoutée

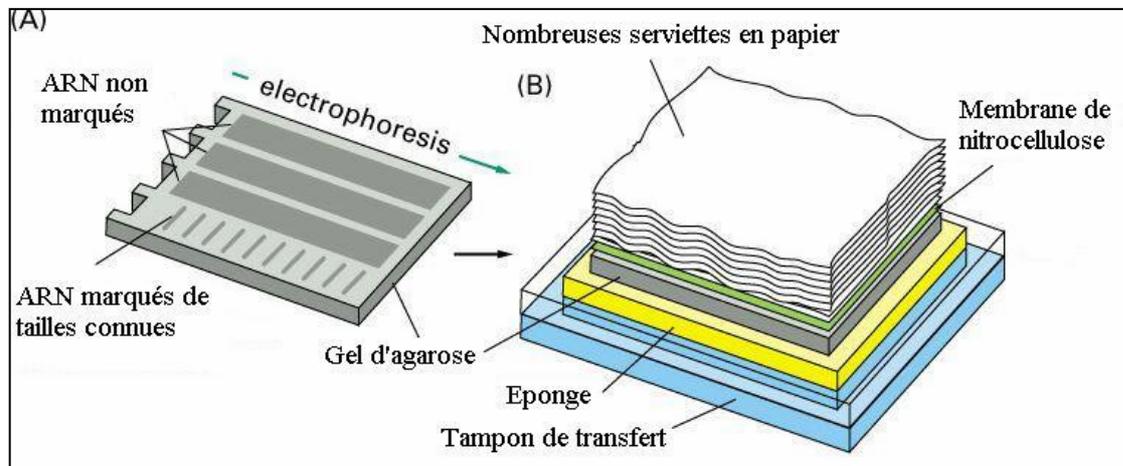


Figure III.6 : Electrophorèse des ARN sur gel d'agarose en conditions dénaturantes (A) et transfert sur membrane de nitrocellulose (B).

La dénaturation des ARN est importante pour permettre une migration uniquement fonction de leur poids moléculaire. Le flux de tampon créé par le papier absorbant permet le transfert des ARN. La fixation des ARN sur la membrane est réalisée par exposition aux ultraviolets.

ajoutée à la solution d'hybridation dans le tube contenant la membrane (5 X SSC, 1 X Denhardt's, tampon phosphate 20mM, SDS 6,6 %). L'hybridation est effectuée à 65°C toute la nuit.

II.9.3 Lavages – Exposition

La membrane est ensuite lavée de l'excès de matière radioactive par lavages successifs avec des solutions SSC de moins en moins concentrées (de plus en plus stricte) à 65°C pendant 20 min. Les lavages sont arrêtés après vérification du marquage radioactif spécifique de la membrane au compteur Geiger. La membrane est alors placée au contact d'un film autoradiographique dans une cassette à – 80°C pendant quelques heures à quelques jours. Le film est par la suite révélé et analysé. La membrane peut être déshybridée par lavage dans une solution de SDS 0,1 % à 95°C en vue d'une nouvelle hybridation.

III Résultats

III.1 Vérifications préliminaires concernant l'homogénéité génétique de chacune des souches et leur différenciation

Une première analyse en AFLP a été effectuée en utilisant de l'ADN génomique de six échantillons de Bourbon "pointu" et "rond", extraits chacun de feuilles d'arbres ramenés de La Réunion à Montpellier, de l'ADN de feuilles d'un Arabica Typica et d'un autre Bourbon provenant d'Amérique du sud, maintenus en serre depuis plusieurs années. Au total 12 couples d'amorces ont été utilisés et 17 marqueurs polymorphes ont ainsi pu être relevés. Seulement cinq d'entre eux ont montré une différence entre Bourbon pointu et Bourbon (un seul étant spécifique du Bourbon pointu, car uniquement présent chez lui).

Par la suite, un total de 18 couples d'amorces a été utilisé pour évaluer la diversité génétique des dix jeunes plants de Bourbons pointu et des dix de Bourbons, issus de graines collectées à La Réunion, et cultivés en serre à l'IRD-Montpellier. L'expérience a été répétée à deux reprises de façon à vérifier la cohérence des résultats. Les résultats obtenus de ces deux répétitions ont permis d'éliminer des faux positifs détectés en outre lors de l'expérience précédente. Sur l'ensemble des analyses effectuées, soit un total de 919 marqueurs, seul un couple d'amorce (E.ACT*/M.CAT) a montré une bande permettant de distinguer les Bourbons pointu des Bourbons. Cette dernière, potentiellement intéressante et présente uniquement chez les Bourbons, a été extraite du gel, clonée et envoyée au séquençage. Les résultats des comparaisons de la séquence obtenue, avec les banques de gène (BLAST/NCBI)

ont montré qu'elle (185 bp) ne présente pas d'homologie avec les séquences disponibles dans les bases de données. Elle pourrait donc correspondre à une séquence non codante.

Tous les autres marqueurs sont toujours présents à l'intérieur de l'échantillon de chaque descendance. En cas d'hétérozygotie résiduelle, il est attendu en autofécondation quelques marqueurs AFLP présentant la ségrégation 75:25 (les AFLP sont des marqueurs dominants). Aucun marqueur de ce type n'a été observé. Les deux descendances comparées sont bien homogènes et ne diffèrent que par un marqueur.

III.2 ESTs analysés dans les banques SSH d'Arabica

III.2.1 Résultats du séquençage

Deux banques soustraites (SSH) ont été construites dans le cadre de la recherche de gènes différentiellement exprimés : « la SSHbp », enrichie en gènes préférentiellement ou spécifiquement exprimés chez la variété Bourbon pointu par rapport au Bourbon et sa banque reverse « la SSHb ». Ces banques ont été construites à partir de la surface aérienne du second prélèvement, quatre mois après la mise en germination (annexe 8). Les produits de ligation des deux banques SSH ont été envoyés directement au séquençage. Pour chacune d'elles, 1 152 clones de plasmides bactériens ont été séquencés puis analysés. Les ESTs obtenues ont permis d'évaluer rapidement la qualité des banques et d'avoir un aperçu de leur contenu.

Ces banques constituent maintenant, par ailleurs, une source de données pour le groupe des Bourbons et pour l'espèce Arabica en générale.

Dans la banque SSHbp, 85% des séquences ont été considérées comme « valides » et ont donc pu être analysées par le logiciel d'analyse ESTdb. Les autres séquences étaient soit de trop petite taille, soit de mauvaise qualité ou encore correspondaient au vecteur vide. En ce qui concerne l'autre banque, pour les mêmes raisons, 17% des ESTs ont été rejetées par le logiciel (Tableau III.3).

Parmi les séquences valides, 68% des ESTs de la SSHbp sont des singletons c'est à dire qu'ils ne correspondent à aucune séquence des autres ESTs de la même banque (Tableau II.3). Cette donnée est fournie par le logiciel ESTdb après alignement et comparaison des séquences. Seule la moitié des séquences sont en singleton dans l'autre banque. Toutes les autres séquences appartiennent à des clusters (112 dans la SSHbp et 152 dans la SSHb) (Tableau II.3).

Tableau III.3 : Valeurs prises à partir de 1152 gènes séquencés dans chacune des deux banques SSHbp (Banque soustractive spécifique du Bourbon pointu soustraite par le Bourbon) et SSHb (Banque soustractive spécifique du Bourbon soustraite par le Bourbon pointu). bp : paire de bases

	SSHbp	SSHb
Nombre de séquences valides	974 (85%)	957 (83%)
Nombre de séquences avec polyA:	94	108
Nombre de séquences avec polyT:	79	107
Longueur max d'un insert :	816 bp	814 bp
Longueur mini d'un insert:	76 bp	77 bp
Longueur moyenne d'un insert:	462 bp	431 bp
Séquences singleton:	658 (68 %)	471 (49 %)
Séquences appartenant à un cluster:	316 (32 %)	486 (51 %)
Nombre de séquences non valides	178 (15%)	195 (17%)
Nombre de séquences de petite taille:	67 (38 %)	74 (38 %)
Nombre de séquences de mauvaise qualité:	72 (40 %)	83 (43 %)
Nombre de séquences sans insert:	39 (22 %)	38 (19 %)
Nombre de clusters	112	152
Nombre de contigs:	133	152
Taille moyenne d'un cluster:	549 bp	181
Taille max d'un cluster:	1115 bp	514 bp
Taille mini d'un cluster:	74 bp	1062 bp

III.2.2 Classements des ESTs

Les différents classements des ESTs ont été effectués à partir des 974 séquences valides de la SSHbp et des 957 de la SSHb.

III.2.2.1 Classement préliminaire selon la probabilité d'homologie de fonction de l'EST

Le premier classement nommé "préliminaire regroupé" est un classement général qui ne tient pas compte de la fonction (potentielle) des séquences codées (Figure III.7) mais uniquement de la probabilité d'homologie avec des séquences de fonction connue. Il a montré que les deux banques sont "structurellement" très semblables. En effet, environ 55% (54% pour SSHbp et 61% pour SSHb) des séquences présentent des homologies fortes avec des séquences de fonction connue (catégories correspondant à des gènes de « fonction connue », à des « protéines putatives ou probables » de fonction connue) présentes dans les bases de données consultées. Le quart des séquences sont des « no hit », c'est-à-dire ne montrant aucune homologie avec des séquences connues accessibles.

III.2.2.2 Classement selon la fonction de l'EST

Un second classement regroupe les gènes selon leur fonction. Il ne concerne donc que les ESTs présentant une forte homologie de séquences avec des gènes de fonction connue lors du premier classement. Pour la SSHbp, 526 ESTs ont été classées, et 584 chez la SSHb.

Deux classes de gènes différencient les deux banques (Figure III.8) :

- Les gènes liés au fonctionnement chloroplastique/Photosynthèse. Environ 27% des gènes de fonction connue de la SSHb sont impliqués dans la photosynthèse, contre 3% dans le cas de la SSHbp.

- Les gènes impliqués dans les fonctions liées « à l'expression et/ ou la modification des gènes et des protéines » (nommée « Protéine et gène »). Ils représentent environ 53% des gènes de fonction connue dans la SSHbp (280 ESTs) pour seulement 19% (111 ESTs) dans la SSHb.

Dans cette dernière classe, une plus forte représentation des gènes "Maturation des protéines", correspondant à des "heat shock proteins" (HSP), a été constatée chez la SSHbp. Ces gènes sont impliqués dans la réponse et la tolérance ubiquiste aux stress. L'autre sous-classe importante, appelée « expression », fait aussi la différence entre B et BP.

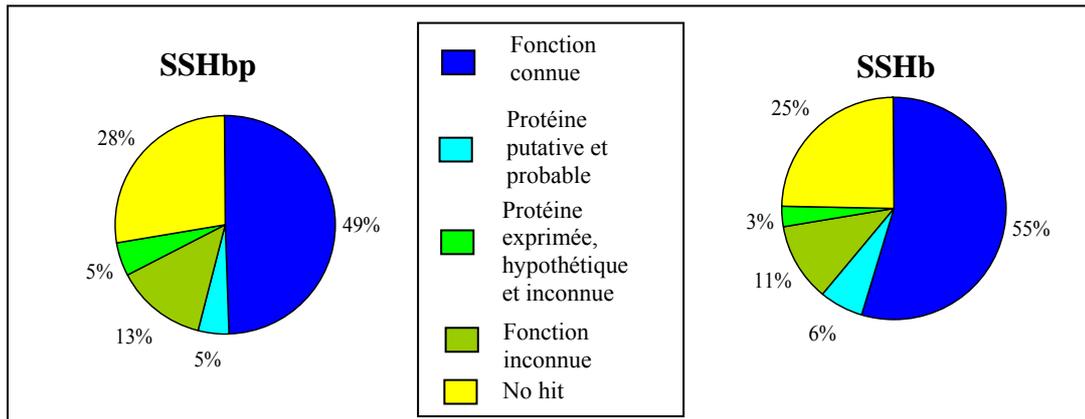


Figure III.7 : Classement « Préliminaire regroupé » tenant compte uniquement la probabilité d'homologie avec des séquences de fonction connue. Pour la SSHbp, le classement a été effectué à partir de 974 séquences, pour la SSHb à partir de 957 séquences.

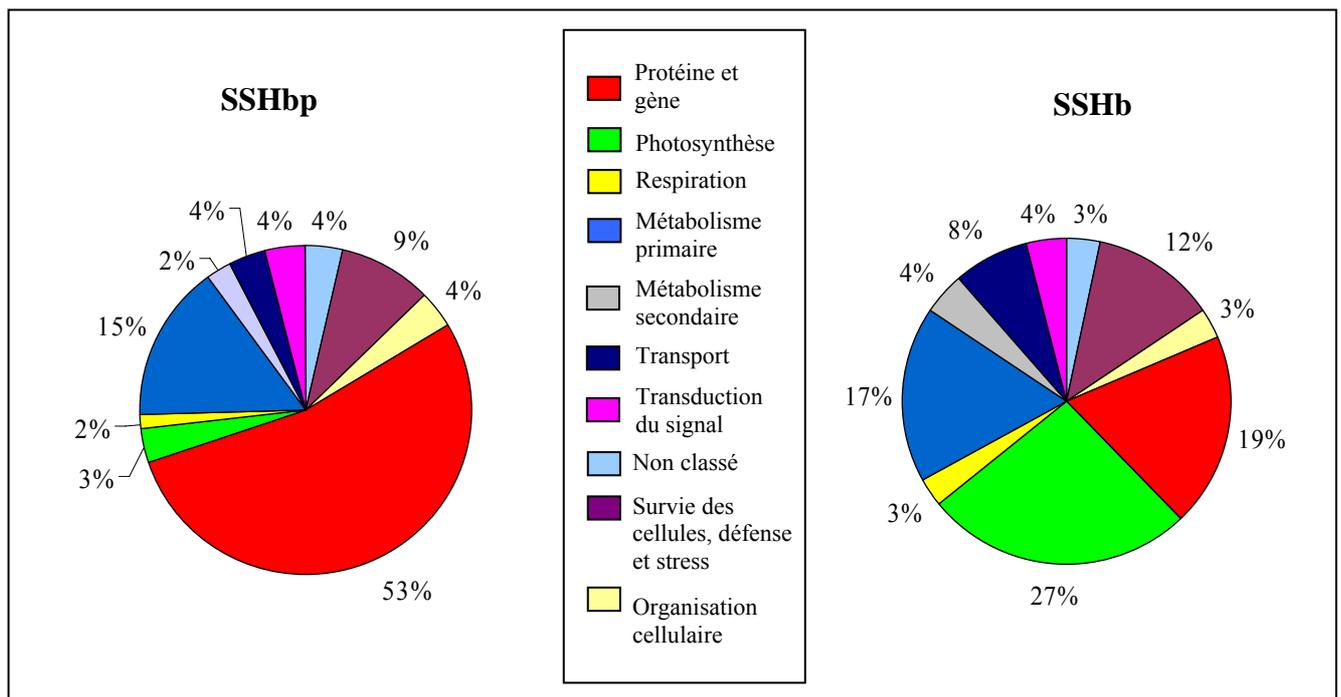


Figure III.8 : Classement des ESTs selon leur fonction. Seules les ESTs présentant une forte homologie de fonction lors du premier classement sont analysées. Pour la SSHbp, 526 ESTs ont été classées, et 584 chez la SSHb

Elle représente pour la SSHbp et la SSHb respectivement 49% (137 ESTs) et 68% (75 ESTs) de la classe « Protéine et gène ». Ce sont surtout des gènes de transcription/facteur de transcription, DNA binding, hélicase...-. (Figure III.9)

Comme les séquences correspondants aux protéines ribosomales, les plus abondantes en général, sont rares (neuf pour la SSHbp et six pour la SSHb), la soustraction/suppression peut être considérée comme efficace.

Enfin, s'agissant de la qualité gustative de BP, il nous a semblé intéressant de se pencher sur la catégorie « Métabolisme primaire ». Cependant les banques ont été construites à partir de l'ensemble des parties aériennes de jeunes plantules entières et non pas à partir des grains. Il est ainsi difficile d'extrapoler les résultats obtenus, bien que le métabolisme global de la plante soit susceptible d'interférer sur celui du grain. Ces catégories sont globalement représentées de façon semblable chez B (17 % des gènes de fonction connue) et chez BP (15%) (Figure III.8). Cependant, dans la SSHbp, 80% des gènes de ces catégories se répartissent équitablement entre les sous-classes « lipides » et « carbohydrates », alors que dans la SSHb, 49% de ces gènes sont dans la sous-classe « carbohydrates » et uniquement 18% dans celles des « lipides » (Figure III.10). Ce rapport carbohydrates/lipides peut correspondre à des « orientations métaboliques » différentes entre BP et B (qui pourraient expliquer la différence de qualité future des fruits ?).

III.3 Obtention des macro-arrays

Au total, une cinquantaine de filtres a été réalisée par banque soustraite : les amplicons correspondant aux ESTs de la banque SSHbp et à ceux de la SSHb sont déposés respectivement sur les filtres SSHbp et les filtres SSHb.

III.3.1 Résultats des amplifications des clones bactériens

Pour les clones ESTs de la SSHbp, plus de 88% des amplifications PCR se sont avérées correctes (une seule bande nette) et 8 % ont présenté des doubles bandes, tandis que 4 % des clones n'ont pas été amplifiés. Ces derniers correspondent le plus souvent à des séquences non valides identifiées par le logiciel ESTdb.

Le même type de répartition est observé pour les clones ESTS de la SSHb : 85% d'amplifications correctes, 9% de doubles bandes et 6% de clones non amplifiés.

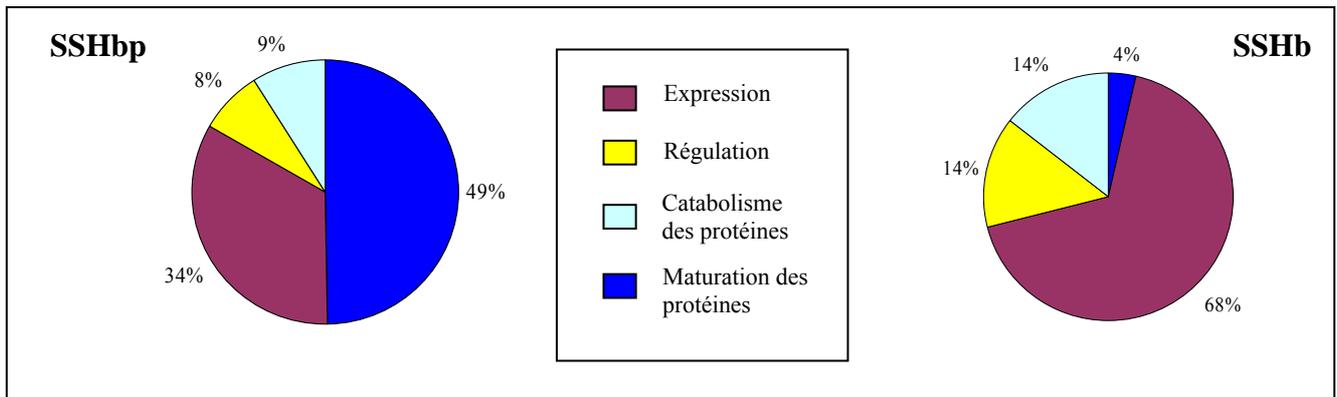


Figure III.9 : Classement dans la catégorie « Protéine et gène ». Pour la SSHbp, 280 ESTs ont été classées, et 111 chez la SSHb.

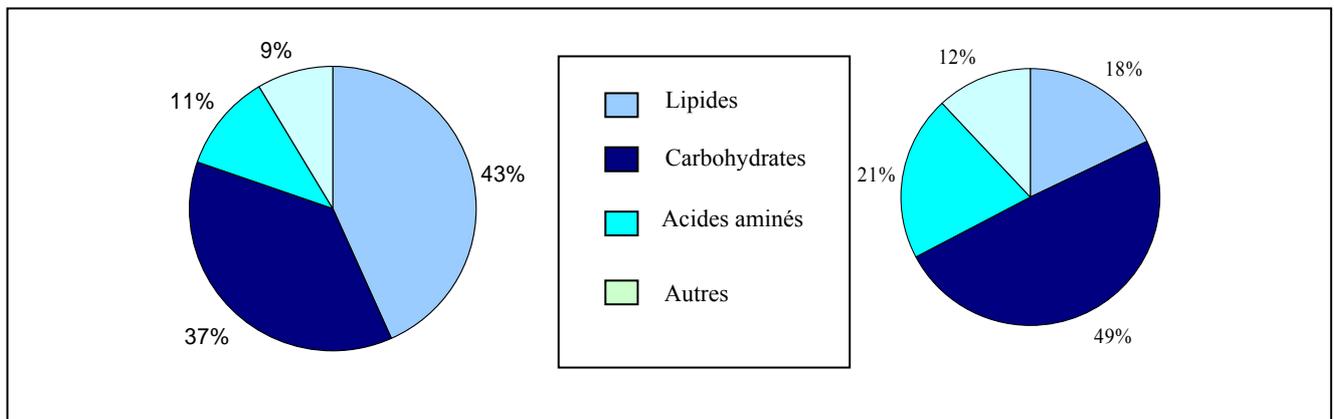


Figure III.10 : Classement dans la catégorie « Métabolisme primaire ». Pour la SSHbp, 94 ESTs ont été classées, et 101 chez la SSHb.

III.3.2 Hybridation des *macro-arrays* avec les ADNc soustraits obtenus par la méthode SSH

Dans un premier temps, une hybridation est effectuée avec les deux populations d'ADNc soustraits ayant servi à l'élaboration de nos banques SSHbp et SSHb. Le but est de confirmer l'efficacité de la soustraction des banques, et de ce fait leur utilité dans cette étude.

Les signaux produits après hybridation révèlent une fixation préférentielle des ADNc soustraits sur les clones de la banque correspondante (Figure III.11). Les clones sont classés en fonction du rapport des signaux d'hybridation obtenus avec les deux types de cibles (ratio signal-BP/signal-B) et sont considérés sur la base de ce ratio comme donnant ou non un signal différentiel. Parmi les clones montrant un signal plus fort avec les ADNc de la SSHbp (i.e ratio BP/BR > 2), la grande majorité (78%) était issue de la banque SSHbp. Inversement, les ESTs s'étant hybridés plus intensément avec les ADNc de la SSHb (i.e ratio BR/BP < 2) sont issus à 80% de la banque SSHb.

III.3.3 Estimation de la variabilité entre filtres

Pour tester la reproductibilité du dépôt d'un filtre à l'autre, une série d'hybridations est réalisée avec trois filtres indépendants incubés avec la même cible complexe synthétisée par une seule réaction de rétro-transcription (RT).

Les coefficients de corrélation des signaux d'hybridation, calculés entre filtres deux à deux (Tableau III.4), ont des valeurs égales ou supérieures à 0,96. Les signaux obtenus entre deux filtres sont donc semblables et la variabilité entre filtres, concernant les dépôts d'ADN (reproductibilité du dépôt) peut être considérée comme faible. En conséquence, les répétitions se font sur des filtres séparés.

III.4 Mise au point d'une méthodologie d'analyse statistique des signaux radioactifs à partir des témoins

L'objectif est de mettre en place une méthodologie d'analyse statistique des données adaptée à ces dernières. Elle comporte plusieurs étapes de vérifications en réponse aux questions suivantes :

- Peut-on analyser les données brutes par analyse de la variance ? En d'autres termes, suivent-elles une loi normale ?
- Quel est le niveau de variation du bruit de fond et y-a-t-il des sources d'hétérogénéité ?

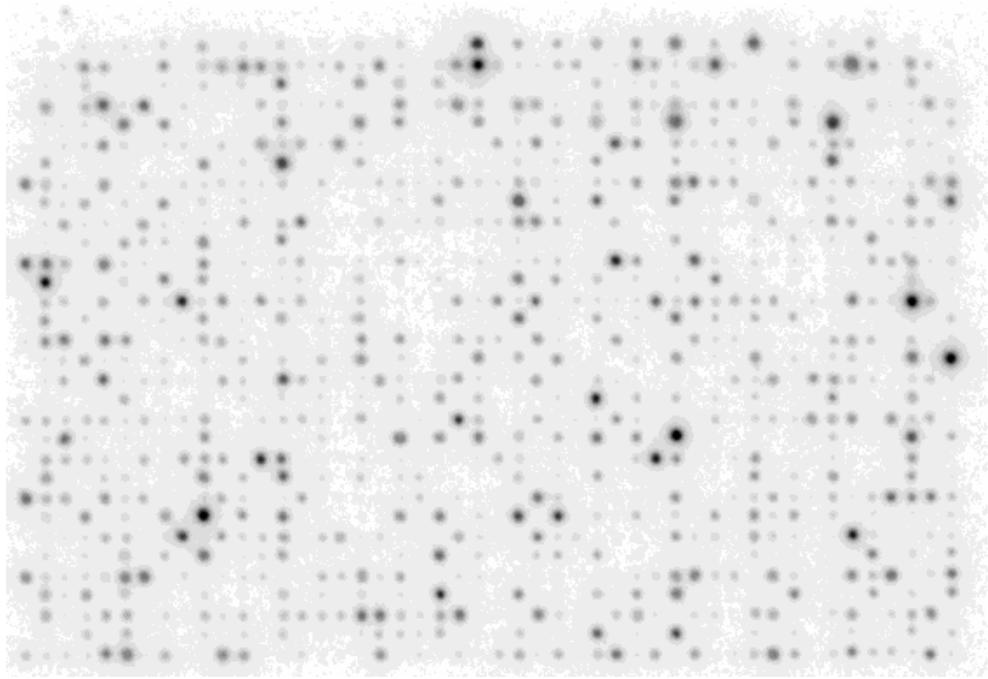
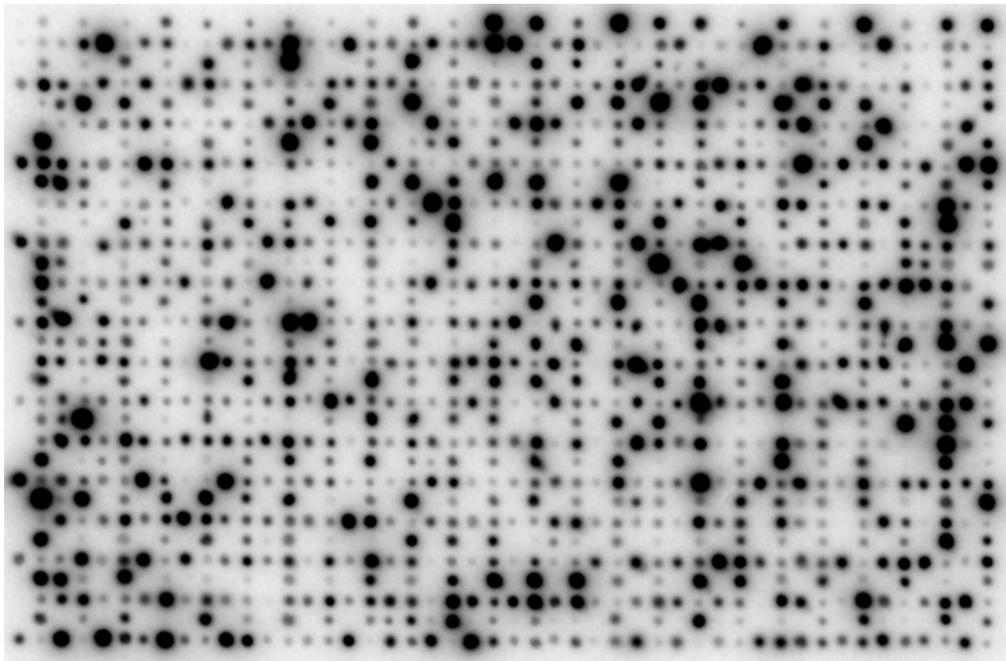
A**B**

Figure III.11 : Hybridation des filtres avec les ADNc soustraits utilisés obtenus lors de la construction des banques SSH. Les signaux produits après hybridation révèlent une fixation préférentielle des ADNc soustraits sur les clones de la banque correspondante. A) Filtre de type SSHb hybridé avec une cible issue des ADNc de la SSHbp, B)) Filtre de type SSHrb hybridé avec une cible issue des ADNc de la SSHb.

Tableau III.4 : Comparaison 2 à 2 des coefficients de corrélation obtenus à partir des signaux normalisés de trois filtres indépendants (f2, f4, f6) hybridées avec la même cible (Bourbon)

Filtre n° 1	Filtre n° 2	Coeff de corrélation
f 2	f 4	0,98
f 2	f 6	0,97
f 4	f 6	0,96

- Y-a-t-il des points aberrants dans le bruit de fond ? Et comment les éliminer ?
- Comment corriger les valeurs brutes par le bruit de fond ?
- Y-a-t-il des variations entre témoins négatifs ?
- Est-ce que l'intensité du signal corrigé d'une EST par le bruit de fond est liée à sa concentration ?
- Y-a-t-il une source d'hétérogénéité liée à la rétrotranscription ? Comment la corriger ?

III.4.1 Transformation des données

Les valeurs générées par les hybridations, que cela soit pour les bruits de fond ou les valeurs des sondes ESTs, suivent une loi log-normale. En conséquence, la transformation logarithmique des données est préconisée pour répondre à la condition de normalité requise par les analyses paramétriques. Les résultats sont notés « Ln(Bkgd) » (pour les bruits de fond) ou « Ln(brut) » (pour les ESTs).

III.4.2 Sources d'hétérogénéité du bruit de fond

L'intensité moyenne du bruit de fond Ln(Bkgd) ne change pas entre les cibles B et BP. En revanche, elle fluctue entre filtres (Tableau III.5). Notons que le carré moyen résiduel de cette dernière analyse correspond au coefficient de variation (CV) des données avant transformation. Ce dernier s'avère peu élevé (3,7% pour les filtres SSHbp et 3,4 % pour les filtres SSHb). Ainsi, avant même le tri des points aberrants, les valeurs de CV montrent la qualité des filtres.

III.4.3 Élimination des points aberrants du bruit de fond

La figure III.12 montrant le bruit de fond en fonction du filtre fait ressortir des points aberrants. Ceux-ci correspondent à des valeurs anormalement élevées assimilées à des traces de radioactivité aspécifiquement fixées sur les filtres. Un bruit de fond est considéré comme aberrant lorsqu'à la suite d'une ANOVA, le résidu correspondant est supérieur ou inférieur à trois fois la valeur de l'écart type résiduel. Ce dernier correspond à la racine carrée du carré moyen résiduel. Le processus est itératif, l'élimination d'un point aberrant modifiant le carré moyen résiduel. Une fois les points aberrants retirés, le coefficient de variation est tombé à 2,8% pour les filtres SSHbp et à 2,5% pour les filtres SSHb.

Tableau III.5 : Résultats des ANOVA à modèle hiérarchisé et fixe par type de filtre sur les valeurs Ln(Soustrait) de 100 bruits de fond pris au hasard sur les filtres.

Type de filtre	Facteur « cible »	Facteur « filtre »
Bourbon pointu	$F_{1,6} = 3,25$ $p = 0,12$	$F_{6,792} = 1,28$ $p < 10^{-20}$
Bourbon	$F_{1,6} = 2,80$ $p = 0,14$	$F_{6,792} = 2,02$ $p < 10^{-20}$

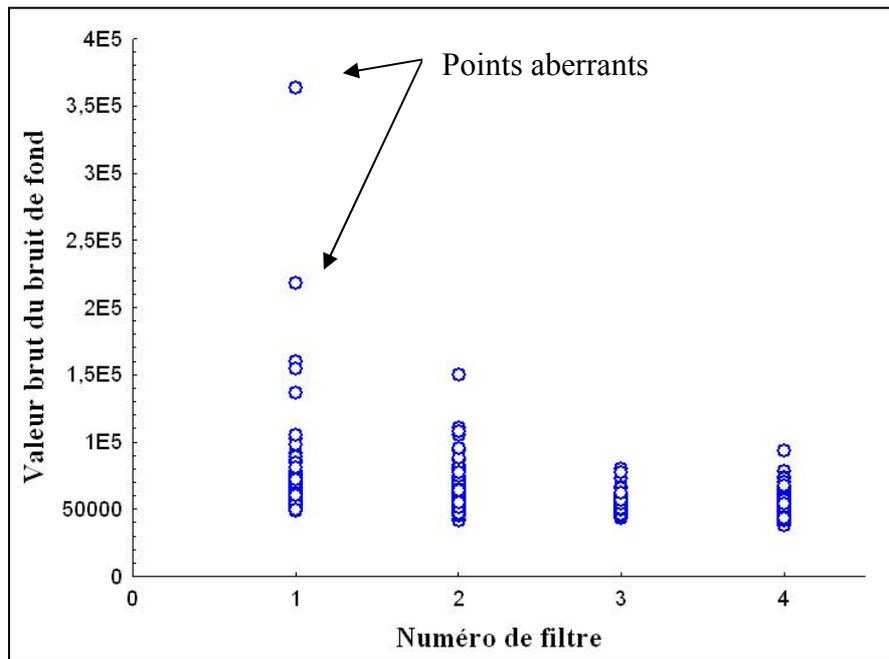


Figure III.12 : Valeurs brutes des bruits de fond en fonction du filtre. L'exemple est pris ici sur les quatre filtres de type SSHbp hybridés avec les quatre répétitions de cible BP. Les flèches indiquent deux points aberrants.

III.4.4 Correction des valeurs brutes par le bruit de fond

Seules les ESTs ne possédant aucun bruit de fond aberrant lors des huit hybridations ont été analysées.

III.4.4.1 Principe de la méthode d'élimination du bruit de fond

Pour chaque témoin, il est calculé la moyenne des huit Ln(Brut) et des huit Ln(Bkgd). Ces deux variables sont liées par une relation linéaire de type (Figure III.13) :

$$\text{Ln(Bkgd)} = a + b \cdot \text{Ln(Brut)}, \text{ avec } a = 0,19 \text{ et } b = 0,95 \text{ (} p < 10^{-6} \text{ et } r^2 = 0,90 \text{)}.$$

Il s'agit de supprimer cette liaison où le bruit de fond est d'autant plus important que le signal brut l'est. En posant $b = 1$ dans le modèle, l'équation est simplifiée en $\text{Ln(Bkgd)} = a + \text{Ln(Brut)}$ », avec $a = 0,39$. Ceci conduit à $\text{Ln(Soustrait)} = \text{Ln(Brut)} - \text{Ln(Bkgd)} = -a$. La variable Ln(Soustrait) ne dépend plus du bruit de fond ($p = 0,59$) (Figure III.14).

Il est néanmoins nécessaire de vérifier si la correction ne génère pas des artefacts.

III.4.4.2 Vérifications de l'efficacité de la soustraction

La première vérification concerne un éventuel effet du type de cible (B ou BP). En fait, ce dernier n'est pas mis en évidence que ce soit sur les Ln(Brut) ou les Ln(Soustrait).

La seconde met en comparaison les filtres. Dans ce cas, il est noté une hétérogénéité entre les filtres. Pour les huit filtres de type SSH bp, l'hétérogénéité représentant 21% de la variance totale avant soustraction, tombe à 3,4% pour Ln(Soustrait). Dans le cas des huit filtres de type SSHb, l'hétérogénéité de 19% avant soustraction est complètement éliminée après.

III.4.5 Vérification sur les témoins négatifs

Théoriquement, les témoins négatifs ne doivent pas montrer de variations selon le type de cible (B ou BP) et ne pas présenter de différences entre eux. Ceci constitue l'objectif de cette vérification.

Comme attendu, les valeurs moyennes Ln(Soustrait) des témoins négatifs ne changent ni en fonction du type de cible ($F_{1, 35} = 0,11$; $p = 0,74$), ni en fonction de la nature du témoin ($F_{2, 35} = 2,58$; $p = 0,09$). L'absence d'interaction a aussi été testée ($F_{2, 35} = 2,35$; $p = 0,11$).

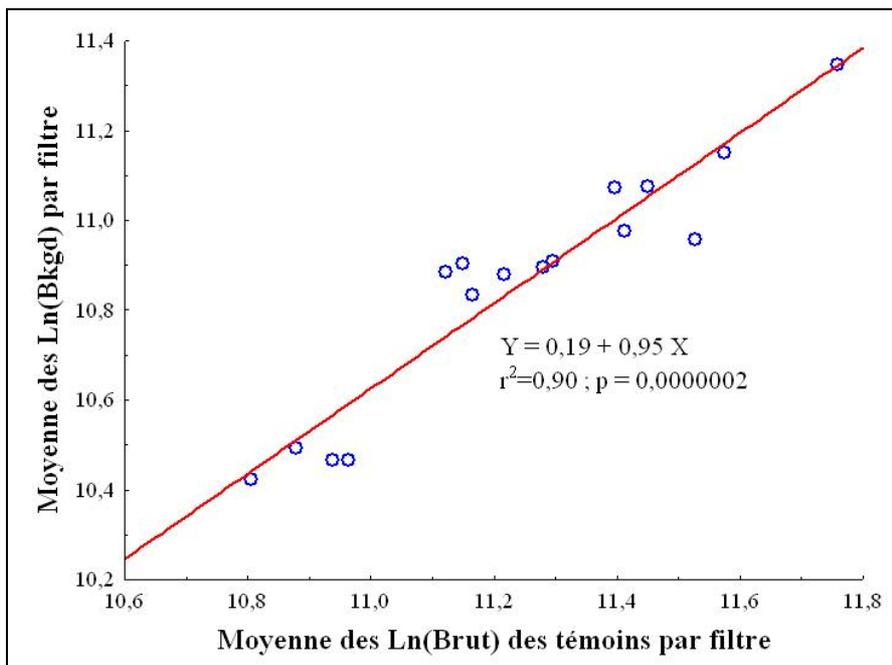


Figure III.13 :
Moyenne par filtre des logarithmes népériens des valeurs brutes des bruits de fond (Ln(Bkgd)) en fonction de la moyenne par filtre des logarithmes népériens des valeurs brutes des témoins (Ln(Brut)). Les données sont liées par une relation linéaires.

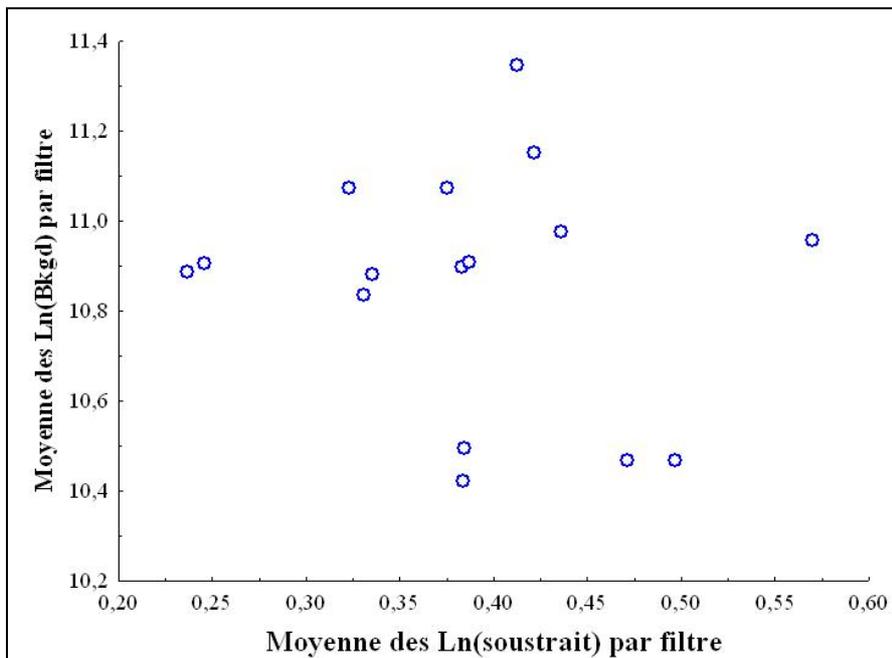


Figure III.14 :
Moyenne par filtre des logarithmes népériens des valeurs brutes des bruits de fond (Ln(Bkgd)) en fonction de la moyenne par filtre des des valeurs corrigées des témoins (Ln(Soustrait)). La correction permet de supprimer la relation de linéarité qui existait.

III.4.6 Vérification de la réponse à des concentrations différentes

Les résultats d'un *macro-array* n'ont de sens que s'il existe une relation entre la fréquence de l'EST dans les cDNA marqués et l'intensité du signal soustrait. Cette vérification peut-être réalisée sur deux témoins positifs, l'actine et l'ubiquitine, pour lesquels nous disposons de plusieurs niveaux de dilution sur les filtres.

- Analyse de l'actine

La valeur Ln(Soustrait) dépend bien du niveau de dilution ($F_{4, 44} = 65,2$; $p < 10^{-6}$). Comme attendu, les deux types de cibles n'ont pas d'impact sur ces valeurs ($F_{1, 44} = 0,04$; $p = 0,84$). Enfin, il n'y a pas d'interaction « niveau de dilution x type de cibles » ($F_{4, 44} = 0,99$; $p = 0,42$). Les moyennes sont indiquées dans le tableau III.6.

La fonction inverse (exponentielle) permet l'obtention du rapport « Intensité brute/Bruit de fond » pour chaque dilution. Ce rapport est lié à la valeur de dilution selon l'équation $Y = 1 + 0,78 X$ ($r^2 = 0,997$ et $p = 0,00007$) (Figure III.15).

avec $X =$ valeur de dilution

$Y =$ rapport « Intensité brute/bruit de fond »

Lorsque la concentration tend vers zéro, le rapport tend vers 1. En d'autres termes, comme attendu, l'intensité brute tend vers celle du bruit de fond.

- Analyse de l'ubiquitine

Des résultats similaires sont obtenus avec l'ubiquitine. L'effet de la concentration est toujours significative ($F_{4, 38} = 20,4$; $p < 1.10^{-6}$) et il n'y a pas de différences entre les deux types de cibles ($F_{1, 36} = 0,96$; $p = 0,33$), ni d'interaction ($F_{4, 36} = 0,52$; $p = 0,72$). Les moyennes sont indiquées dans le tableau III.7

La relation entre le rapport « Intensité brute/Bruit de fond » et la dilution est de nouveau linéaire : $Y = 0,93 + 1,47 X$, avec $X =$ valeur de dilution et $Y =$ rapport « Intensité brute/Bruit de fond » ($r^2 = 0,985$ et $p = 0,0007$). La valeur de Y tend vers 1 lorsque X tend vers zéro.

III.4.7 Mise en évidence d'une source d'hétérogénéité liée au tube d'hybridation

Une hétérogénéité entre tubes d'hybridation peut être induite par les lavages, mais surtout par la rétrotranscription qui sert à obtenir la cible. Pour cette raison, nous parlerons

Tableau III.6 : Moyenne des Ln(Soustrait) de l'actine en fonction des concentrations. Les lettres en exposant représentent le résultat du classement des moyennes selon le test de Tukey. La solution-mère C0 a été diluée de moitié afin d'obtenir la solution C1, à partir de laquelle la solution C2 a été obtenue (dilution 1/2). Cette dernière a servi de solution-mère à la solution C3 (dilution 1/2).

Concentration	Ln(Soustrait)
C0	0,579940 ^a
C1	0,337842 ^{bc}
C3	0,205154 ^{bcd}
C2	0,079085 ^{cde}
C4	0,008492 ^{de}

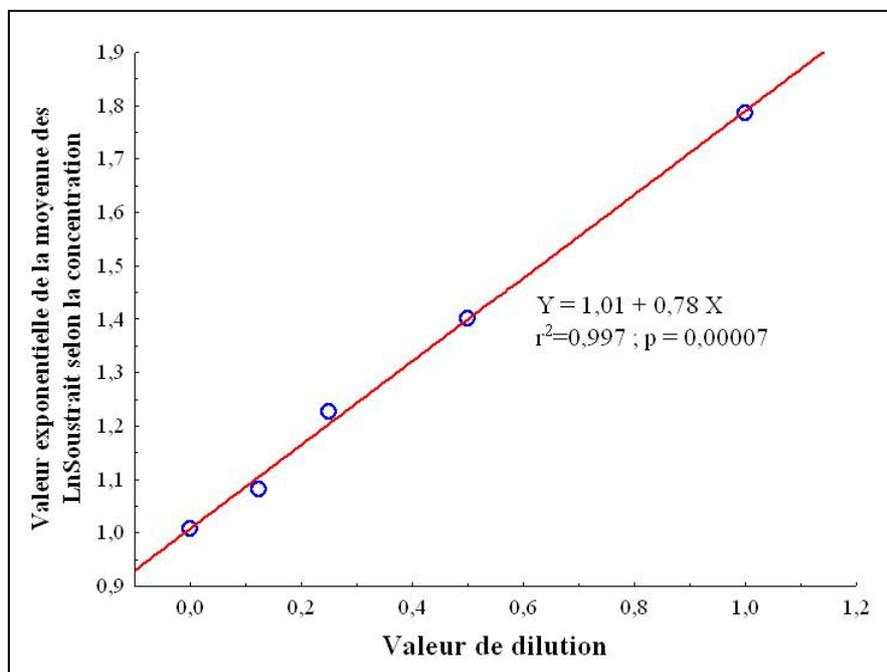


Figure III.15 : Exponentielles des moyennes des valeurs corrigées de l'actine (Ln(Soustrait)) par concentration en fonction de la valeur de dilution. Cette relation est linéaire de type « $Y = a \cdot X + b$ » avec $b = 1$ et $a = 0.8$

Tableau III.7 : Moyenne des valeurs corrigées (Ln(Soustrait)) de l'ubiquitine en fonction des concentrations. Les lettres en exposant représentent le résultat du classement des moyennes selon le test de Tukey.

Concentration	LnSoustrait
C0	0,853966 ^{ab}
C1	0,562182 ^{abc}
C3	0,307198 ^{bcd}
C2	0,102855 ^{cde}
C4	-0,156184 ^{de}

d'effet RT. Cet effet a été testé séparément selon les cibles B et BP en utilisant les valeurs Ln(Soustrait) recueillies sur les témoins positifs.

Dans le cas des cibles BP, les témoins positifs sont différents entre eux comme attendu ($F_{2, 35} = 58,7$; $p < 1.10^{-6}$). Surtout il n'y a pas d'effet RT ($F_{3, 35} = 1,8$; $p = 0,16$), ni d'interaction ($F_{6, 35} = 0,60$; $p = 0,73$). En revanche, dans le cas des cibles B, il existe non seulement une différence liée à la nature du témoin ($F_{2, 36} = 47,9$; $p < 1.10^{-6}$), mais surtout entre RT ($F_{3, 36} = 7,99$; $p = 0,0003$). Néanmoins, l'effet RT est le même quel que soit le témoin (absence d'interaction : $F_{6, 36} = 1,9$; $p = 0,10$).

Par souci d'homogénéité, la méthode de correction sera appliquée aux deux types de cibles. Celle-ci consiste en un centrage des données par rapport à la moyenne de la RT :

$$\text{Ln(Corrigé)}_{ijk} = \text{Ln(Soustrait)}_{ijk} - [\text{M(Ln(SSH))}_{ik} - \text{M(Ln(SSHbp))}_{ik}]$$

Avec :

i : numéro du filtre

j : type de cible

k : type de filtre

Ln(Corrigé)_{ijk} : signal corrigé de l'EST déposé sur le filtre « i » de type « k » et hybridée dans le tube « i »

M(Ln(SSH))_{ik} : Moyenne de l'ensemble des signaux corrigés générés par toutes les cibles de type « i » sur les filtres de type « k »

M(Ln(SSHbp))_{jk} : Moyenne de l'ensemble des signaux corrigés générés sur le filtre « i » de type « k »

Une vérification du résultat de la correction réalisée par ANOVA sur les données Ln(Corrigée) montre que l'effet RT observé avec la cible B sur les données Ln(Soustrait) a disparu.

Enfin, la correction a surtout permis de diminuer les carrés moyens résiduels des analyses de variance dans le cas des cibles B et donc d'augmenter l'efficacité des analyses de la variance (Tableau III.8).

III.4.8 Conclusions

Une méthodologie permettant la comparaison des EST par ANOVA avec le maximum d'efficacité a été mise au point sur les témoins et va être appliquée à l'ensemble des données.

Tableau III.8 : Carrés moyens résiduels (CMr) des analyses de variance à un facteur (sur la nature du témoin positif). Exemple pris pour les cibles B et des filtres BP ou B.

	CMr Ln(Brut)	CMr Ln(Soustrait)	CMr Ln(Corrigée)
Filtres BP	0,13289	0,0927	0,0670
Filtres B	0,05685	0,0709	0,0449

III.5 Identification de gènes différentiellement exprimés

Cette identification a été réalisée pour les ESTs pour lesquelles nous avons les huit répétitions Ln(Soustrait) d'hybridation (modèle équilibré) se sont avérées valides. Ce sont ainsi 960 et 1002 ESTs appartenant respectivement aux banques SSHbp et SSHb qui seront analysées statistiquement.

Comme pour les témoins positifs, une hétérogénéité existe entre RTs. Le centrage des données pour obtenir les valeurs Ln(Corrigée) a été réalisée avec les valeurs du tableau III.9.

D'après le tableau III.9, la cible B4 montre des signaux d'hybridation très variables selon le type de filtre, contrairement aux autres cibles. Cette observation n'a pu être expliquée et par précaution les valeurs des ESTs issues de cette hybridation ont été exclues des analyses.

III.5.1 Classement des ESTs par rapport aux témoins négatifs

Le test de Dunnett permet de classer les ESTs, au seuil de 5%, en quatre classes :

- Classe 1 : Ensemble des ESTs dont le signal d'expression, quelle que soit la cible, ne se différencie pas de celui des témoins négatifs,
- Classe 2 : Ces ESTs ont eu une expression différente de celle des témoins négatifs avec les cibles de type B, mais pas avec celles de type BP. Elles ne seraient théoriquement surexprimées que chez le Bourbon,
- Classe 3 : Cas inverse du précédent. Ces ESTs ne seraient surexprimées, en théorie, que chez le Bourbon pointu ;
- Classe 4 : Ensemble des ESTs dont le signal d'expression, quelle que soit la cible, s'est différencié des témoins négatifs.

Le tableau III.10 donne les effectifs observés pour chaque classe. Les classes 1 et 4 renferment 97% des ESTs. Seulement 16% des ESTs appartiennent à la classe 1 : ce sont probablement des gènes faux-positifs présents après soustraction ou des gènes pour lesquels le nombre de répétition s'est avéré insuffisant pour mettre en évidence une différence d'expression avec les témoins négatifs.

En théorie, qualitativement, les ESTs des classes 2 (surexprimés chez - ou spécifiques - de Bourbon) et 3 (surexprimés chez - ou spécifiques - de Bourbon pointu) sont les plus intéressants de part leur réponse en analyse *macro-arrays*.

Tableau III.9 : Valeurs des écarts à la moyenne par cible (BP : cible de type pointu, B : cible de type rond) et par filtre (Filtre BP et B). Les Ln(Soustrait) sont soustraits de la valeur moyenne du tube dans lequel il était (dernière ligne).

	BP 1	BP 2	BP 3	BP 4	B 1	B 2	B 3	B 4
Mb P	0,085	0,053	-0,087	-0,051	0,142	-0,018	-0,285	0,161
Mb R	0,069	0,011	-0,079	-0,001	0,198	0,090	-0,171	-0,116
Moyenne	0,0769	0,0319	-0,0827	-0,0261	0,1699	0,0358	-0,2282	0,0224

Tableau III.10 : Effectifs observés pour les quatre classes déterminées par le test de Dunnet.

Classe 1 : ESTs dont les signaux ne se différencient pas de ceux des témoins négatifs

Classe 2 : ESTs surexprimées chez B

Classe 3 : : ESTs surexprimées chez BP

Classe 4 : ESTs dont les signaux sont différents de ceux des témoins négatifs pour les deux types de cibles

Classe	Nombre d'ESTs issues de la banque SSHbp	Nombre d'ESTs issues de la banque SSHb
1	233	63
2	0	2
3	24	18
4	703	769

Pour les filtres SSHbp, 24 ESTs sont dans la classe 3 et aucun dans la classe 2. Parmi ces 24, deux ESTs sont des sondes considérées comme non valides par le pipeline ESTdb (chromatographie illisible), mais avec une amplification correcte (bandes nettes sur gel d'agarose lors de la vérification). Quatre n'ont pas d'homologie de séquences dans les bases de données internationales (« no hit »). Les 16 autres ont des fonctions très variées (Annexe 6A).

Pour les filtres SSHb, deux ESTs se retrouvent dans la classe 2 et correspondent à des « no hits ». Dix-huit ESTs sont dans la classe 3 : deux d'entre elles n'ont pu être séquencées (mais donnent des amplifications correctes), une correspond à un « no hit » et les 15 autres ont des fonctions diverses (Annexe 6B).

Il existe une forte hétérogénéité dans les effectifs des classes 2 (2) et 3 (42). Ceci est dû à une importante différence de carrés moyens résiduels pour les cibles B et BP, et ce, malgré les corrections apportées. Pour s'avérer significativement différente des témoins négatifs, la moyenne des signaux corrigés générés par l'hybridation des cibles BP doit être supérieure à 0,25 environ, alors que celle des signaux corrigés générés par l'hybridation des cibles B doit être supérieure à 0,43 environ.

Ce problème est à l'origine d'une incohérence pour trois ESTs de la SSHbp présents dans la classe 3, mais montrant des ratios d'expression « BP/B » inférieurs à 1 (Tableau III.11). En fait, elles devraient en théorie appartenir à la classe 4. Ceci montre les limites statistiques du tri.

III.5.2 Cas des ESTs de la classe 4 montrant un différentiel quantitatif d'expression entre Bourbon et Bourbon pointu

Des différences significatives ont été mises en évidence entre ESTs et entre variétés. Surtout, la présence d'une interaction montre que la différence de signal entre ESTs change selon la variété comme attendu.

Au seuil de 5%, respectivement 31 ESTs et 39 ESTs sont considérées comme différemment exprimées, sur les filtres SSHbp et SSHb (annexe 7). Les valeurs du risque de première espèce s'échelonnent entre $p = 0,046$ et $p < 1.10^{-15}$. Comme attendu, aucune des 39 ESTs identifiées sur les filtres SSHbp n'est commune à celles identifiées sur les filtres SSHb, et inversement.

Tableau III.11 : Les trois ESTs de la SSHbp présentant une incohérence : présents dans la classe 3, mais montrant des ratios d'expression « BP/B » inférieurs à 1. Moy Cbp (respectivement Cb) : moyenne pour la cible de type BP (respectivement B). Dunnet Cbp (respectivement CB) : valeur du test de Dunnet pour la comparaison de la moyenne Cbp (respectivement Cb) avec les témoins négatifs.

Symbole de l'EST	Moy Cbp	Dunnet Cbp	Dunnet Cb	Moy Cb	Nom	ratio BP/B
CA-S01_001_H02	0,0005	0,0005	0,7552	0,1367	Pas valide	0,0038
CA-S01_010_F01	0,2452	0,0064	0,5468	0,2641	Pas de hit	0,9285
CA-S01_005_G06	0,2906	0,0016	0,4873	0,3108	OSJNBb0013J13.11	0,9348

III.5.2.1 ESTs différemment exprimées sur les filtres SSHbp

Parmi les 39 ESTs montrant un signal d'hybridation différent avec les cibles B et BP sur les filtres SSHbp, dix n'ont pu être séquencées (chromatographie de mauvaise qualité), et cinq correspondent à des « no hits ». Parmi les 24 restantes, dix huit ne sont pas représentés plus d'une fois dans ce groupe et treize ont des numéros d'accessions uniques dans la banque SSHbp. Ces 39 ESTs ont montré une amplification PCR correcte lors de l'obtention des sondes. Parmi ces ESTs des filtres SSHbp, 33 se montrent surexprimées en utilisant la cible Bourbon et six seulement en hybridant la cible Bourbon pointu (Annexe 7A), ce qui constitue un paradoxe. En effet, cette banque est sensé contenir des gènes surexprimés chez le Bourbon pointu par rapport au Bourbon.

III.5.2.2 ESTs différemment exprimées sur les filtres SSHb

Parmi les 31 ESTs montrant un signal d'hybridation différent avec les cibles B et BP sur les filtres SSHb, huit n'ont pu être séquencés (chromatographie de mauvaise qualité) et onze correspondent à des « no hits ». Les 12 séquences restantes ne sont pas représentées plus de deux fois dans ce groupe et parmi elles, sept sont des singletons parmi l'ensemble des ESTs séquencés de la banque SSHb. Ces 31 ESTs ont montré une amplification PCR correcte lors de l'obtention des sondes (Annexe 7B). Parmi ces ESTs, 29 sont surexprimées comme attendu chez le Bourbon et deux seulement chez le Bourbon pointu.

III.6 Validation par RT-PCR semi-quantitative et Northern des gènes montrant une différence d'expression lors des macro-arrays

Des RT-PCR ont été effectuées sur les ARN traités du stade 4 (Annexe 8) à partir de feuilles et tiges de jeunes plantules de BR et BP afin de valider le différentiel d'expression de gènes candidats entre les deux variétés d'Arabica. Cette vérification est théoriquement nécessaire, suite aux problèmes d'hybridation croisée (« cross hybridation »). Ces analyses ont été réalisées sur le même ARN de référence qui a servi à faire les analyses de *macro-arrays*. Des ARN issus de différents stades de croissance étaient aussi disponibles au laboratoire et ont servi à la construction des membranes Northern.

D'après l'analyse statistique des résultats d'hybridation des filtres en *macro-arrays*, 70 fragments de gènes (clones EST) présentant un différentiel d'expression significatif ont été sélectionnés (annexe 7). A chacun d'entre eux est associé : 1) une probabilité, plus ou moins forte, de se tromper en affirmant que ce différentiel existe et 2) un ratio des intensités

d'expression (le ratio BP/B). Plus ce ratio est élevé, plus le gène concerné est « sur exprimé » chez la variété BP, et inversement.

III.6.1 Premières sélections de 37 clones.

Parmi les 70 clones, 37 sont d'abord retenus d'après l'intérêt potentiel de la fonction du gène, la probabilité d'erreur et la valeur du ratio. Une gamme assez large de probabilités ($4,6 \cdot 10^{-2}$ à $6,7 \cdot 10^{-13}$) et de ratios BP/BR (0,28 à 7,72) est choisie afin de comparer les résultats obtenus par la technique RT-PCR semi-quantitative et ceux issus des *macro-arrays*.

Les couples d'amorces sont dessinés et testés pour amplifier les clones choisis (Tableau III.12). Ces tests sont effectués sur des ADNc provenant des rétro-transcriptions (RT) des ARN des deux variétés. Sur les 37 clones, quatre n'ont pu être amplifiés de manière correcte (double bande, signal diffus ou absence de bande) (Figure III.16).

Ces tests conduisent aussi à déterminer le cycle où le produit PCR devient visible sur le gel d'agarose. Généralement, il est détectable entre le 10ème et le 31^{ème} cycle. Enfin, cinq prélèvements, distants de trois cycles chacun, permettent pour tous les gènes de couvrir le domaine de variation compris entre l'absence de signal et son niveau maximal atteint de manière asymptotique. Le différentiel d'expression entre les deux variétés est décelable au cours de la phase exponentielle (Figure III.17). Dans des conditions identiques de PCR pour les deux variétés, plus un gène sera exprimé, plus sa phase exponentielle d'amplification, et donc de surcroît sa phase asymptotique, sera atteinte tôt. Ce différentiel est ensuite visualisé après séparation des bandes PCR par électrophorèse sur gel d'agarose. Néanmoins, les bandes, marquées au BET, ne sont décelées que si la concentration du produit PCR est suffisamment élevée ou si la différence est marquée. L'intensité des bandes est quantifiée et une analyse statistique est effectuée sur les valeurs des signaux générés.

III.6.2 Validation de dix gènes candidat par RT semi-quantitative

Une sélection arbitraire de dix clones est nécessaire pour être compatible avec les contraintes du dispositif expérimental (plus de 80 données par gènes). Cette décision s'est portée sur les gènes dont la fonction semble la plus intéressante et dont le différentiel d'expression est ressorti dès la première visualisation sur gel d'agarose. Tous les produits PCR envoyés à séquencer correspondent aux EST attendus (Tableau III.12). La spécificité des amorces est ainsi vérifiée. La première correction des signaux obtenus bruts consiste à soustraire le bruit de fond des valeurs obtenues pour l'intensité du signal de chaque prélèvement déposé sur gel. Il n'a pas été nécessaire ici d'effectuer une transformation

Tableau III.12 : Séquences des amorces utilisées pour amplifier les dix clones sélectionnés et le témoin (l'Ubiquitine). L : première amorce, R : seconde amorce.

Symbole de l'EST		Séquence	Symbole de l'EST		Séquence
CA-S02_008_F08	L	GAAGGCTCAGAGGAGATGATTG	CA-S01_009_A02	L	GCTGGTGCCAAGTCTGTTATG
	R	TGTCCTTACCGTCTGTCTGTTG		R	GTTTCGGATGGGAGGTGTAG
CA-S02_003_E08	L	GCTCAGAAGCAGGTTGTTGAAG	CA-S01_006_A06	L	GATTAGCGGTTGCTGAAGGAG
	R	GGATGGAAGGCTGACACAGG		R	CATAGTAGTGGCCCTGTTGTTG
CA-S02_005_F10	L	CAATGCGCCTATGATGTAGC	CA-S01_009_E01	L	CGTCACCGTCAGTTCTGCT
	R	GTAAGGGCCATCCTATCCAAC		R	CCACCTTCACTTCTCCTTCT
CA-S02_006_B04	L	AGTCGGAGAAAAAGGGGAGAG	CA-S01_012_D06	L	GCCAAGATGGTAGGGAGGTT
	R	CCCGAAGACAATAGACAGACG		R	CCGGACAGAGTTCAGTATCTCAG
CA-S02_002_G06	L	AAGGA ACTAAGGCGCTACAACC	Ubiquitine	L	CTCCACCTCTCAGAGCAAGAAC
	R	CACCACCTCCTCACC ACTACTAA		R	GGGTGGAGGAGAAAGAAGGAAT
CA-S02_005_C02	L	GAAGGCTCAGAGGAGATGATTG			
	R	TGTCCTTACCGTCTGTCTGTTG			

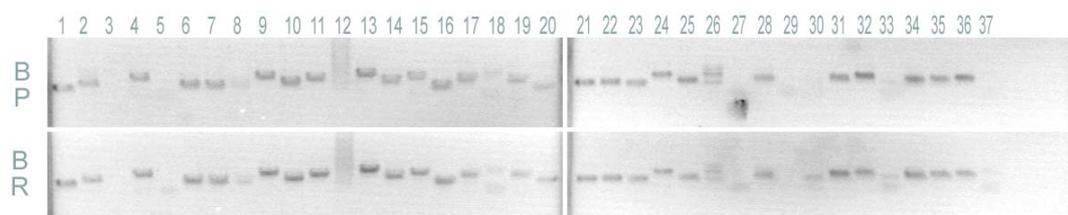


Figure III.16 : Test des 37 couples d'amorces à partir d'ADNc de BP et B.

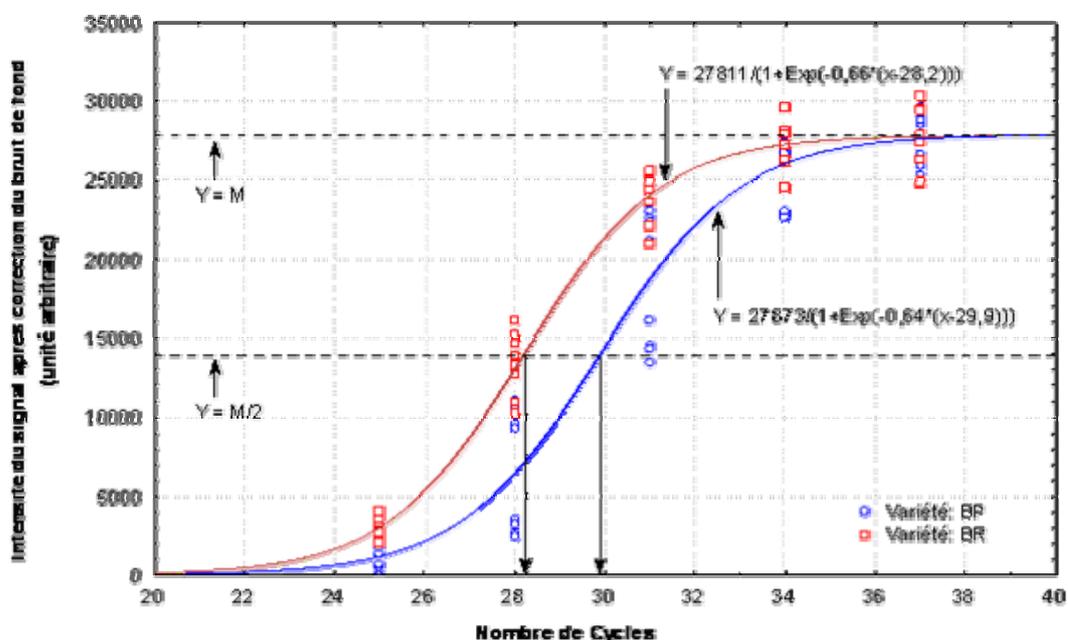


Figure III.17 : Distribution des données PCR obtenues pour le clone CA-S01_009_E01 (intensité du signal corrigée du bruit de fond en fonction du nombre de cycles PCR). Pour chaque variété (BP en bleu et BR en rouge) une régression ajustée a été effectuée. La projection de l'intersection des courbes avec la droite $Y=M/2$ sur l'axe des abscisses donne les deux valeurs de b .

logarithmique des données. Le modèle statistique d'analyse de variance décrit dans le matériel et méthode permet d'obtenir la puissance de test maximale.

Une première vérification est faite à partir du témoin Ubiquitine, gène considéré comme constitutif et donc sensé ne pas montrer de différentiel d'expression. Un exemple, le clone « CA-S01_009_E01 », décrit la technique d'analyse (Figure III.17). Enfin une synthèse permet de rendre compte de la totalité des résultats sur les 10 clones sélectionnés.

III.6.2.1 Analyse du témoin Ubiquitine

Le gène témoin de l'Ubiquitine est choisi sur des critères théoriques et à partir des expériences préalables menées dans le laboratoire. Son analyse, faite dans les mêmes conditions que les autres gènes candidat, ne montre pas, comme attendu, de différence entre les deux variétés ($F_{1,46} = 2,23$; $p = 0,14$).

III.6.2.2 Un exemple d'analyse

L'un des dix clones montre (CA-S01_009_E01), surexprimé chez Bourbon d'après les analyses *macro-arrays*, une similitude de séquence avec une protéine de stress (HSP) : il va servir ici d'exemple d'analyse. Le modèle attendu d'amplification de type sigmoïde [$Y = M/(1+e^{a(X-b)})$] est vérifié en traçant l'intensité du signal corrigé en fonction du nombre de cycle (Figure III.17). Un ajustement est obtenu pour chacune des deux variétés. Leur comparaison montre le différentiel d'expression observé pour ce gène.

Les paramètres estimés sont :

Bourbon : $M = 27811$, $a = -0,66$; $b = 28,2$

Bourbon Pointu : $M = 27873$, $a = -0,64$; $b = 29,9$

Les estimations de la variable aléatoire « M » (asymptote) sur ces expériences sont très proches. Parmi les deux autres paramètres, le plus intéressant est le paramètre « b » qui représente le nombre de cycles pour un signal équivalent à « M/2 ». Ce graphe va dans le sens d'une « surexpression » du gène chez B. Par la suite, le dernier cycle (37), donnant une intensité en saturation sera retiré de l'analyse des données.

L'analyse de variance met en évidence des effets hautement significatifs de la variété ($F_{1,21} = 164$; $p < 1.10^{-7}$), mais également du nombre de cycle ($F_{3,21} = 1299$; $p < 1.10^{-7}$) et du blocs ($F_{7,21} = 18,5$; $p < 1.10^{-7}$). Ainsi, la surexpression du gène chez la variété Bourbon mise en évidence par RT-PCR confirme les résultats obtenus par *macro-arrays*.

III.6.2.3 Synthèse des résultats pour tous les clones

Sur les dix clones, un seul ne montre pas de différence variétale ($F_{1,38} = 2,35$; $p = 0,13$) (Tableau III.13 et Figure III.18). Il s'agit du clone « CA-S02_006_B04 » codant pour un gène homologue à un transporteur de type ABC. Ce gène correspond à celui montrant le risque de première espèce le plus élevé en *macro-arrays* ($p = 2,88.10^{-2}$). Enfin, les résultats sont totalement cohérents avec ceux obtenus en *macro-arrays*, puisque que les ratios BP/BR vont toujours dans le même sens (Tableau III.14).

III.6.3 Validation de quatre gènes par Northern

Les expériences de Northern blot ont servi à tester le différentiel d'expression sur d'autres stades de croissance que celui utilisé pour l'analyse en RT-PCR. Quatre membranes nylon ont été construites à partir d'ARN de plantules (parties aériennes hors cotylédons) des stades 3, 5, 6, 7 et 8 (annexe 8, plantules âgées entre 4 mois et 7 mois après mise en germination). Les comparaisons portent sur les couples « ARN totaux de B/ARN totaux de BP » à tous les stades. Après électrophorèse, les ARN issus des stades 5, 6 et 7 apparaissent dégradés (signal diffus lors de la coloration au bleu de méthylène). Les résultats portent donc uniquement sur la comparaison des variétés pour les stades 3 et 8.

Quatre gènes parmi les dix validés par RT semi-quantitative sont retenus pour être hybridés chacun avec une des membranes :

- Deux gènes ont montré, d'après les analyses statistiques sur RT-PCR, des niveaux de certitude élevés ($p < 1.10^{-7}$) et ont présenté un ratio BP/B *macro-arrays* inférieur à 0,38 (donc surexprimés chez B). Ces gènes sont CA-S02_003_E08 (qui code une enzyme vacuolaire) et CA-S01_009_E01 (qui code une Heat Shock Protein). Dans les deux cas, l'autoradiographie issue des Northern indique, comme attendu, une surexpression chez B (Figures III. 19 et III.20).

- Les deux autres gènes ont montré des niveaux de certitude moindre ($p = 4,4.10^{-5}$ et $p = 1,8.10^{-2}$) et ont présenté un ratio BP/B *macro-arrays* supérieur à 0,56. Ce sont les gènes CA-S02_008_F08 (qui code une glutamate synthase) et CA-S02_005_F10 (qui code une sous-unité du complexe NADH déshydrogénase). Dans le premier cas, il y a surexpression du gène chez B, mais le différentiel n'est visible sur Northern qu'au niveau des ARN issus des feuilles âgées de 7 mois. Dans le second, le différentiel n'est visible pour aucun des ARN utilisés (Figure III.21 et III.22)

Tableau III.13 : Résultats des ANOVA pour les dix clones sélectionnés et le témoin puis comparaison avec les résultats précédents de *macro-arrays*. « No hit » : pas d'homologie de séquence avec les bases de données.

Code EST	Description	Résultats				
		RT-PCR			Macro-arrays	Validation du différentiel <i>macro-arrays</i> par RT-PCR
		Test Statistique	Valeur du Test	Probabilité p pour l'effet variété	Test de Bonferroni (Probabilité p)	
CA-S02_003_E08	vacuolar processing enzyme-1b	F _{1,15}	172,85	<10 ⁻⁷	6,73E-13	oui
CA-S01_006_A06	putative alcohol dehydrogenase	F _{1,28}	58,87	<10 ⁻⁷	2,68E-03	oui
CA-S01_009_E01	heat shock protein 18p	F _{1,21}	163,886	<10 ⁻⁷	9,33E-09	oui
CA-S02_008_F08	Glutamate synthase, chloroplast precursor	F _{1,37}	21,41	0,000044	2,65E-03	oui
CA-S01_009_A02	beta-ketoacyl-CoA synthase family	F _{1,26}	14,77	0,000703	2,06E-03	oui
CA-S02_002_G06	no hit	F _{1,20}	7,535	0,012	1,02E-03	oui
CA-S02_005_C02	no hit	F _{1,29}	6,42	0,017	9,06E-04	oui
CA-S02_005_F10	NADH dehydrogenase subunit J	F _{1,26}	6,401	0,018	1,81E-04	oui
CA-S01_012_D06	vacuolar processing enzyme-3	F _{1,12}	4,7679	0,0496	7,23E-07	oui
CA-S02_006_B04	putative ABC transporter family protein	F _{1,38}	2,35	0,13	2,88E-02	non
Témoin	Ubiquitine	F _{1,46}	2,23	0,14		

Tableau III.14 : Comparaison des ratios « BP/B » (ratio des intensités d'expression entre les deux variétés) obtenus lors des analyses par RT-PCR (en phase exponentielle) et par *macro-arrays*, pour les dix gènes sélectionnés et le témoin.

Code EST	Description	Résultats		
		RT-PCR		Macro-arrays
		Cycle	Ratio BP/B	Ratio BP/B
CA-S02_008_F08	Glutamate synthase, chloroplast precursor	28	0,88	0,60
CA-S02_003_E08	vacuolar processing enzyme-1b	25	0,48	0,37
CA-S02_005_F10	NADH dehydrogenase subunit J	25	0,46	0,56
CA-S02_006_B04	putative ABC transporter family protein	34	0,77	0,63
CA-S02_002_G06	no hit	25	0,65	0,57
CA-S02_005_C02	no hit	34	0,90	0,57
CA-S01_009_A02	beta-ketoacyl-CoA synthase family	34	1,12	1,75
CA-S01_006_A06	putative alcohol dehydrogenase	31	1,28	1,68
CA-S01_009_E01	heat shock protein 18p	28	0,49	0,38
CA-S01_012_D06	vacuolar processing enzyme-3	34	0,39	0,49
Témoin	Ubiquitine	34	1,03	

Code EST	Variété	Cycles						
		22	25	28	31	34	37	40
CA-S02_008_F08	BP	[Agarose gel image showing bands for CA-S02_008_F08 BP]						
	BR	[Agarose gel image showing bands for CA-S02_008_F08 BR]						
CA-S02_003_E08	BP	[Agarose gel image showing bands for CA-S02_003_E08 BP]						
	BR	[Agarose gel image showing bands for CA-S02_003_E08 BR]						
CA-S02_005_F10	BP	[Agarose gel image showing bands for CA-S02_005_F10 BP]						
	BR	[Agarose gel image showing bands for CA-S02_005_F10 BR]						
CA-S02_006_B04	BP	[Agarose gel image showing bands for CA-S02_006_B04 BP]						
	BR	[Agarose gel image showing bands for CA-S02_006_B04 BR]						
CA-S02_002_G06	BP	[Agarose gel image showing bands for CA-S02_002_G06 BP]						
	BR	[Agarose gel image showing bands for CA-S02_002_G06 BR]						
CA-S02_005_C02	BP	[Agarose gel image showing bands for CA-S02_005_C02 BP]						
	BR	[Agarose gel image showing bands for CA-S02_005_C02 BR]						
CA-S01_009_A02	BP	[Agarose gel image showing bands for CA-S01_009_A02 BP]						
	BR	[Agarose gel image showing bands for CA-S01_009_A02 BR]						
CA-S01_006_A06	BP	[Agarose gel image showing bands for CA-S01_006_A06 BP]						
	BR	[Agarose gel image showing bands for CA-S01_006_A06 BR]						
CA-S01_009_E01	BP	[Agarose gel image showing bands for CA-S01_009_E01 BP]						
	BR	[Agarose gel image showing bands for CA-S01_009_E01 BR]						
CA-S01_012_D06	BP	[Agarose gel image showing bands for CA-S01_012_D06 BP]						
	BR	[Agarose gel image showing bands for CA-S01_012_D06 BR]						
Témoin Ubiquitine	BP	[Agarose gel image showing bands for Ubiquitin BP]						
	BR	[Agarose gel image showing bands for Ubiquitin BR]						

Figure III.18 : Différentiels d'expression visibles, entre BP et B, sur gel d'agarose, pour les dix clones EST retenus ainsi que le témoin Ubiquitine

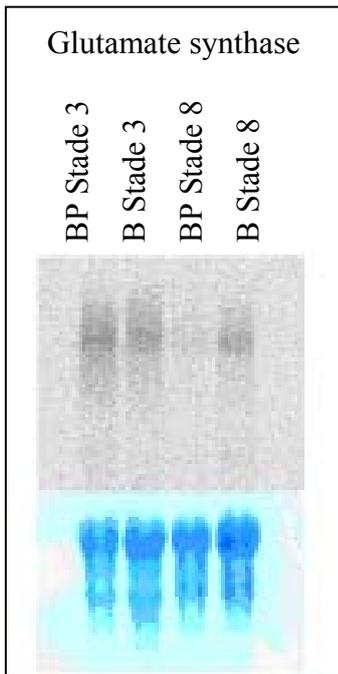


Figure III.20 : Northern Blot effectué en utilisant comme sonde le gène du clone CA-S02_008_F08

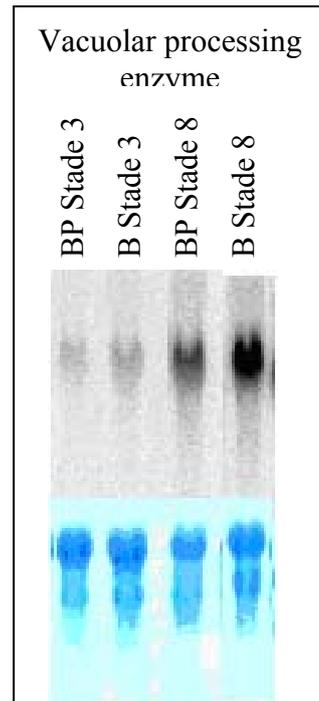


Figure III.19 : Northern Blot effectué en utilisant comme sonde le gène du clone CA-S02_003_E08

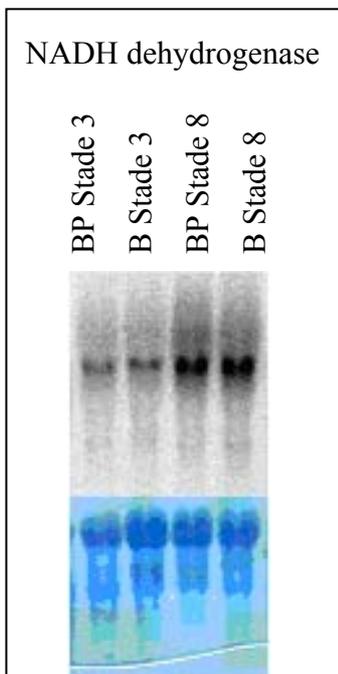


Figure III.22 : Northern Blot effectué en utilisant comme sonde le gène du clone CA-S02_005_F10

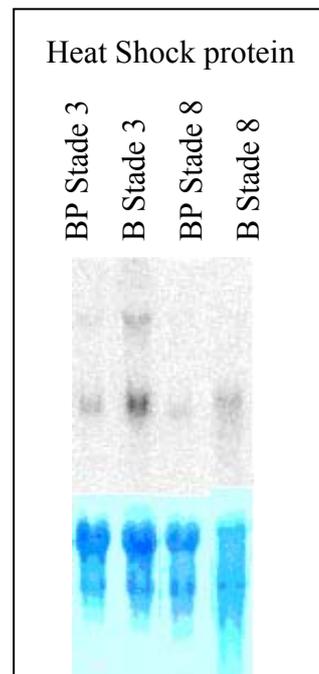


Figure III.21 : Northern Blot effectué en utilisant comme sonde le gène du clone CA-S01_009_E01

IV Discussion

IV.1 Le Bourbon et le Bourbon pointu sont génétiquement très similaires

La technique des AFLP a déjà été utilisée pour de nombreuses analyses génétiques sur les caféiers (exemples Lashermes *et al.*, 2000b ; Anthony *et al.*, 2002a ; Steiger *et al.*, 2002 ; Ky *et al.*, 2000 ; Pearl *et al.*, 2004).

L'ensemble des résultats obtenus en analyse AFLP permet de conclure à une similarité proche de 100% entre les Bourbon et Bourbon pointu (une bande différenciant les deux variétés sur 919 bandes, avec 18 amorces différentes). L'objectif de l'étude est atteint : les deux variétés sont très proches. De plus, les deux descendances utilisées pour l'analyse moléculaire sont homogènes à 100%. Ceci autorise leur comparaison pour inventorier et comprendre les effets de la mutation *Laurina*.

Cette étude débouche sur une conclusion complémentaire quant à l'origine du Bourbon pointu. Deux hypothèses principales sont proposées dans la littérature (voir chapitre I, Synthèse bibliographie) : 1) une origine africaine avec une importation à la Réunion au cours du XVIII^{ème} siècle, et 2) une origine réunionnaise par mutation à partir de la variété Bourbon. La similarité quasi-absolue entre le Bourbon et le Bourbon pointu permet ici de confronter la véracité des différents récits historiques.

Ainsi, l'introduction à la Réunion du Bourbon pointu à partir de l'Afrique à la Réunion est peu vraisemblable. Deux introductions génétiquement indépendantes devraient présenter une similarité moins importante et du même ordre de grandeur que celle existant entre deux accessions prises au hasard au sein de la collection mondiale des souches d'Arabica. Ce n'est pas le cas. En revanche, l'hypothèse d'une mutation apparue à la Réunion et ne concernant qu'un locus comme l'a montré Krug et Carvalho (1951) est tout à fait cohérente avec la similarité observée. La mutation *Laurina* aurait bien eu lieu à La Réunion, il y a deux siècles. Elle a ensuite été détectée à l'état homozygote (elle est récessive), puis propagée du fait de sa résistance reconnue à la sécheresse et de ses grandes qualités organoleptiques.

Il pourrait être intéressant d'analyser plus finement la bande AFLP différenciant le Bourbon du Bourbon pointu. Tout d'abord en vérifiant sa présence quels que soient les échantillons pris en compte. Ceci pourrait aboutir à la mise en place d'une traçabilité lors du commerce du café. Mais aussi en caractérisant plus loin la nature de cette séquence (codante,

intron, ou autre...), et éventuellement d'en déterminer une fonction. Ceci pourrait être fait en tentant d'obtenir un fragment plus long par 3' et 5' RACE, dont la séquence pourrait être reconnue par BLAST, par exemple. Avoir à disposition une séquence plus longue permettrait aussi peut-être d'y trouver des marqueurs et de localiser plus tard cette séquence sur une carte génétique, ce qui permettrait de l'étudier plus finement. A l'heure actuelle, il n'existe pas encore de carte génétique ou physique saturée pour l'espèce arabica, les difficultés étant principalement à son faible polymorphisme et à sa polyploïdie. L'équipe de Pearl et collaborateurs ont néanmoins récemment obtenu une carte génétique d'un croisement entre des cultivars Catimor X Mokka (Pearl *et al.*, 2004). Plusieurs cartes génétiques sont disponibles pour l'espèce *C. canephora* (Lashermes *et al.*, 2001 ; Paillard *et al.*, 1996 ; Crouzillat *et al.*, 2004) et en parallèle plusieurs cartes interspécifiques ont été construites (Coulibaly *et al.*, 2003 : *C. canephora* x *C. heterocalix*; Ky *et al.*, 2000 : *C. pseudozanguebariae* x *C. liberica*; N'Diaye, 2005: *C. liberica* x *C. canephora*).

IV.2 Les banques soustraites comme outil d'analyse du transcriptome

Les banques soustraites constituent un échantillon non-aléatoire du transcriptome pour deux raisons : 1/ les séquences sur-exprimées dans une des conditions mises en comparaison sont sur-représentées dans la banque correspondante ; et 2/ elles ne concernent qu'une partie du transcriptome, celle propre à l'échantillon d'où est extrait l'ARNm (dans notre cas, le stade 2 d'un jeune plant).

Des banques soustraites peuvent être obtenues, même en comparant l'échantillon avec lui-même. Lorsque les échantillons sont physiologiquement très proches, la proportion de faux-positifs sera importante (Ji *et al.*, 2003).

Les banques soustraites nécessitent des conditions parfaites de comparaison. Hormis pour les deux modalités définissant la soustraction, tous les autres paramètres physiologiques doivent être similaires pour les deux modalités. Tout écart entraîne un accroissement du taux de faux-positifs. Ce qui n'exclue pas la présence de vrais positifs qui se trouvent simplement plus dilués.

IV.2.1 Comparaison des classes fonctionnelles des banques SSHbp et SSHb

Les ESTs obtenus par la technique SSH concernent un grand nombre de fonctions métaboliques et ceci est en adéquation avec l'existence connue d'effets pléiotropiques pour cette mutation.

La répartition des clones séquencés par grande catégorie fonctionnelle change entre les banques (Figures III7 à III10). Par exemple, la SSHb présente 27 % de séquences directement ou indirectement associées au fonctionnement chloroplastique/Photosynthèse, alors que la SSHbp n'en contient que 3%. Deux possibilités peuvent expliquer ce résultat :

1) la différence d'expression des gènes impliqués dans la photosynthèse, ou des gènes exprimés dans des compartiments extra-nucléaires, est représentative de phénomènes physiologiques, ou autres, opposant les deux variétés. Ainsi, le fonctionnement chloroplastique / photosynthétique, moindre chez BP, serait l'un des éléments majeurs différenciant B et BP ;

2) la différence d'expression de ces gènes est un artéfact. En effet, un décalage de deux heures sépare les prélèvements des échantillons de B et de BP au cours de la journée, ce qui pourrait se répercuter dans l'expression des gènes. Dans cette hypothèse, la soustraction des deux conditions mettrait en évidence non pas la différence variétale, mais une différence due à l'heure de prélèvement, en début de journée. En effet, l'activité chloroplastique et la transpiration évoluent très rapidement, le matin, dans les premières heures d'éclaircissement.

Les quelques analyses préliminaires effectuées au CEA de Cadarache [Département d'Ecophysiologie Végétale et Microbiologie (DEVM), laboratoire d'Ecophysiologie de la photosynthèse (responsable Bernard Genty)] (données non montrées) vont dans le sens de la seconde hypothèse. Les courbes de réponse de la photosynthèse à la lumière et au CO₂ du Bourbon et du Bourbon pointu sont similaires. Cet exemple souligne les précautions à respecter lors de l'obtention des banques soustractives. Tout à fait récemment, des banques SSH entre jeunes plants au stade « 2 » (même stade de développement des plantules ayant servi à construire nos banques), mais prélevés à 4 h du matin, ont été sous-traitées à Ivrogen. Elles devraient montrer la part commune aux deux couples de banques SSH. Les résultats sont attendus à la fin de l'année 2006.

La deuxième différence importante entre les banques SSHb et SSHbp concerne la catégorie « Métabolisme primaire ». Dans cette catégorie, 80 % des gènes de la SSHbp se répartissent équitablement entre les sous-classes « lipides » et « carbohydrates », alors que 49% de ceux des ESTs de la SSHb sont regroupés dans la classe « carbohydrates » et uniquement 18% dans celle « lipides ». Les hypothèses émises pour les gènes de la photosynthèse restent d'actualité. A un détail près : si un décalage de deux heures dans le prélèvement au cours de la journée explique une variation d'activité photosynthétique, il est moins vraisemblable qu'ils interviennent aussi fortement sur le rapport carbohydrates/lipides.

Ce rapport différenciant les jeunes plants de B et de BP pourrait être une caractéristique liée à la mutation, s'exprimant dans les cellules quel que soit de développement physiologique (jeune plant ou fruit) et pourrait peut-être expliquer la différence de qualité future des grains. Une perspective de ce travail serait de vérifier ce travail avec l'extraction et le dosage des sucres et lipides totaux ou individuels des feuilles et grains à divers âges physiologiques. Les lipides des grains de café ont un rôle important dans la rétention et la stabilité des arômes (Folstar, 1985). Durant la torréfaction, les lipides forment une couche à la surface des grains et piègent les arômes volatiles, limitant ainsi la perte immédiate de ces composés (Clifford, 1985). La meilleure qualité à la tasse des caféiers poussant en haute altitude (>1000m) serait ainsi reliée à une plus grande composition en lipides des grains (Decazy *et al.*, 2003 ; Vaast *et al.*, 2006). Il est possible qu'il en soit de même pour le Bourbon pointu.

Néanmoins, il faut aussi tenir compte que les tris et les classements des ESTs ont été faite avec l'ensemble des ESTs. L'existence de contigs peuvent en effet introduire un biais dans l'interprétation. Il serait bien de refaire le tri en ne tenant compte que des contigs seuls et des singletons. Les pourcentages se retrouveraient alors normalisés, et l'interprétation des différences entre les deux SSH serait plus correcte.

IV.2.2 Pertinence de la technique SSH utilisée

Même si les deux banques contiennent des ESTs identiques entre elles, ou que la présence de certaines découlent d'un prélèvement décalé, de nombreuses ESTs sont spécifiques d'une banque. Ce sont ces dernières qui sont parmi les clones les plus intéressants en matière de recherche de gènes candidats. Ainsi, malgré la présence potentielle de faux positifs, des ESTs différenciellement exprimés de part la mutation Laurina sont présents dans les banques.

On peut également se poser la question si suffisamment d'ESTs ont été séquencées sur nos banques, pour avoir une chance de tomber sur le ou les rares gènes, probablement peu exprimés, à l'origine de la cascade secondaires d'expression d'autres gènes, dont certains sont sûrement présents dans tes banques.

Néanmoins, la technique SSH utilisée enrichit fortement les banques en messagers rares et change ainsi le contenu relatif en séquences. Elle n'est pas le reflet du métabolisme de l'une ou l'autre des conditions étudiées, mais bien un pool de séquences exprimées/peu exprimées dans une condition donnée (Diatchenko *et al.*, 1996 ; Ji *et al.*, 2003)..

Sur la base de nos résultats, il apparaît, *a posteriori*, que les conditions testées présentent très peu de variation en terme d'expression de gènes. La technique SSH décrite par Diatchenko *et al.* en 1996, indique selon leur condition d'analyse, la possibilité d'enrichir jusqu'à 1000 fois en messager rare. L'équipe de Ji *et al.* (2002) a effectué une étude sur la représentativité des séquences dans une banque de type SSH en fonction des tissus utilisés. Cette technique est en réalité très bien adaptée à l'analyse de tissus présentant d'importantes différences (par exemple, deux tissus différents ou encore pour l'étude des gènes exprimés lors d'une infection virale). En revanche, la SSH paraît beaucoup moins performante pour l'analyse de deux conditions dont les différences en contenu d'ARNm sont minimales. D'après Ji *et al.* (2002), seuls les gènes d'une banque SSH présentant à l'origine un ratio de différence d'expression égal ou supérieur à cinq sont certains de ne pas être des faux positifs. De même, ils démontrent qu'un gène possédant une concentration inférieure à 0,1% dans la population totale d'ARNm ne pourra pas être amplifié par la technique SSH, et cela même s'il est différenciellement exprimé. En conclusion, tous les gènes de faible abondance, comme les facteurs de transcription, les cytokinines, et la plupart des régulateurs des processus physiologiques ne pourront être détectés par cette technique.

Dans notre cas, la stratégie utilisée est bien adaptée à un pré-criblage, mais l'étape suivante d'hybridation sur filtre et/ou de séquençage reste indispensable pour trier les clones fortement associés à l'une ou l'autre des conditions testées. La construction des banques SSH a été suivie d'un criblage par hybridation sur filtres à moyenne densité (*macro-arrays*). Ce type de criblage a l'avantage de pouvoir analyser ensemble tous les gènes, mais se caractérise par un bruit de fond qui pose problème en risquant de masquer les gènes les plus faiblement exprimés.

IV.3 Interprétation des résultats issues de filtre moyenne densité

L'objectif de la technique *macro-array* a été d'identifier les conséquences précoces de la mutation Laurina au niveau du transcriptome en comparant des jeunes plants de Bourbon et de Bourbon pointu. Néanmoins, les filtres ont été construits avec les ESTs des banques SSHbp et SSHb obtenues à partir de plantules au stade « 2 » (4 mois à partir de la mise en germination, c'est-à-dire un stade le plus précoce où l'on pouvait discerner nettement les premières différences morphologiques), alors que les cibles sont des ADNc de jeunes plants au stade « 4 » (un mois plus tard : différences morphologiques plus marquées, mais probablement antérieurement moléculairement déterminées).

Tableau III.15 : Sources de variations dans les expérimentations sur puces à ADN. D'après Schuchhardt *et al*, 2000 et Wildsmith et Elcock , 2000

Source de variation	Commentaires
Extraction des ARNm	Les tissus, méthodes, procédures, purification hétérogène...
Rétro-transcription des ADNc	Variations inhérentes à la procédure...
Marquage	Dépend de l'efficacité de l'enzyme, de l'âge de la radioactivité...
Amplification des sondes par PCR	PCR non quantifiable...
Dépôt par les aiguilles	Fluctuations (par ex avec conditions extérieures)...
Volume de sonde pris par les aiguilles lors du dépôt	Fluctuations même pour la même aiguille...
Quantité des cibles déposées sur les filtres	La fraction de sonde prélevée n'est pas nécessairement déposée
Volume de sonde fixée au support	La fraction de cDNA déposée n'est pas celle fixée...
Hétérogénéité entre les filtres	Filtres différents même si de même nature, variations lors des traitements...
Paramètres d'hybridation	Influencés par de nombreux facteurs comme la température du laboratoire, le temps pour faire les différents bains et les changer...
Hybridation non spécifique	Source typique d'erreur (<i>cross-hybridation</i>)...
Bruit de fond aspécifique	Contamination par le puit d'à côté, artefacts...
Analyse des images	Variations lors de la mise en place de la grille d'analyse, contamination des spots...

IV.3.1 Variabilité existant dans les analyses *macro-arrays*

Dans la pratique, l'intensité d'un signal résulte de nombreux facteurs (Tableau III.15) autres que celui différenciant les cibles. Ces variations sont à l'origine d'artéfacts et limitent l'efficacité des méthodes statistiques de traitement des données. Elles doivent être détectées pour être si possible éliminées. Le premier but de l'analyse est de distinguer les variations dues à l'expression différentielle des gènes des signaux artéfactuels générés par l'expérimentation.

Trois grands types de variation sont identifiés dans la littérature comme ayant un impact important : la quantité des chacune des sondes déposées sur les filtres (hétérogénéité entre filtres), la fabrication des cibles ADNc radioactives et les expériences d'hybridations. Ils conduisent tous à des jeux de données incomparables en l'état (bruit de fond, hybridations aspécifiques).

IV.3.1.1 Hétérogénéité des filtres entre eux

Le mode de fabrication des puces à ADN, par dépôt d'ADN amplifié sur des supports solides en verre ou des filtres de Nylon, génère des différences dans la quantité de sondes présente sur chaque filtre. Différents paramètres physiques peuvent engendrer cette variation. Parmi ceux-ci, deux sont principalement à relever : 1) la concentration de la préparation en ADN augmente avec l'évaporation de l'eau contenue dans l'échantillon, surtout lorsque le temps de dépôt est long et que le taux d'humidité relative du local est faible ; 2) de même, la viscosité de l'échantillon peut être un facteur de variation. Plus un échantillon est visqueux (restes de glycérol des réactions d'amplification et de toutes contamination de macromolécules) et plus le volume déposé est important. Ces deux phénomènes, la concentration et la viscosité, augmentant simultanément au cours du dépôt, il est aisé de concevoir une variabilité dans la quantité d'ADNc déposée au cours de la fabrication des filtres. Elle existe *ipso facto* entre chaque filtre et a pour conséquence d'introduire un biais dans toute comparaison entre filtres différents. Certains auteurs (Al-Ghazi, 2003 ; Mantelin, 2005) résolvent ce problème en utilisant le même filtre deux fois (où la première hybridation constitue l'hybridation de référence et la deuxième, l'hybridation test). Ceci permet de comparer les signaux de deux hybridations entre elles sans avoir, en théorie, à gérer ce biais. Mais il en introduit un autre : lors de la déshybridation du filtre, une certaine quantité de sonde peut aussi se décrocher, générant une variation non quantifiable, donc non maîtrisable.

Nous avons préféré utiliser des filtres différents pour chaque échantillon hybridé, mais pour chaque comparaison, les filtres ont été élaborés à des moments très proches. A la vue des expériences sur la reproductibilité des filtres entre eux et des analyses statistiques effectuées par la suite, il apparaît que, dans notre plan d'expérimentation, ce choix s'est avéré pertinent.

IV.3.1.2 Bruit de fond

L'hybridation d'acides nucléiques radioactifs sur les réseaux ADN est génératrice de bruit de fond résultant de la fixation aspécifique de molécules radioactives sur le support. Le seuil de sensibilité de cette technique dépend de l'importance du bruit de fond, car les signaux d'hybridation de faible intensité peuvent être masqués. Les lavages successifs intervenant lors du protocole permettent de décrocher une grande partie de la radioactivité aspécifiquement fixée, mais pas sa totalité, ce qui nécessite l'intégration de corrections appropriés lors de l'analyse de données. De nombreuses méthodes de mesure du bruit de fond ont été mises en place pour cela. Par exemple, la mesure du bruit de fond local (appliquée à chaque sonde indépendamment des autres) est une méthode de mesure bien adaptée aux microréseaux sur lame de verre. Dans ce cas, les sondes ADN sont déposées sur des lames de microscope recouvertes d'un revêtement basique poly-L lysine. Ce dernier n'étant pas toujours homogène, il arrive fréquemment que le bruit de fond des images résultantes ne le soit pas non plus (Schuchhardt *et al.*, 2000 ; Brown *et al.*, 2001) et ceci nécessite ainsi des mesures locales.

Concernant le matériel utilisé au cours de ce travail, les sondes ont été déposées sur un support nitrocellulosique présentant l'avantage d'être homogène sur toute leur surface. Le bruit de fond local a néanmoins été mesuré pour chaque motif, ce dernier étant composé de quatre dépôts d'ESTs (Figure III.5).

IV.3.1.3 Marquage

Le marquage des ARNm par rétrotranscription et incorporation simultanée de phosphore radioactif est la technique mettant en œuvre le moins d'étapes, par comparaison aux techniques type Affymétrie, et puces à ADN (utilisant des étapes d'amplification). Elle est donc la moins soumise aux biais introduits par l'expérience sur les quantités relatives de chaque molécule du mélange à analyser (Bertucci *et al.*, 1999 ; Schuchhardt *et al.*, 2000). En revanche, les qualités physico-chimiques de la cible complexe peuvent fluctuer selon plusieurs facteurs inhibant la réaction de rétrotranscription. Ainsi la taille moyenne des ADNc radiomarqués et la quantité nette de radioactivité incorporée peut être différente entre deux marquages indépendants de transcriptomes identiques. Ces facteurs agissant sur l'efficacité de

la transcription inverse sont généralement les traces de contaminants de type phénol ou DEPC non éliminées au cours de la préparation des ARN totaux. La qualité des ARN totaux au départ est donc très importante. Celle des cibles complexes peut également varier expérimentalement comme dans toute manipulation de biologie moléculaire. Concrètement, en partant de quantités d'ARN égales, plusieurs cibles complexes préparées à partir des mêmes purifications auront des taux d'incorporation différents. Ceci aura pour conséquence de modifier l'intensité de tous les signaux, sans pour autant refléter des modifications dans les quantités d'ARNm présents au départ. La variabilité observée dans le taux d'incorporation de la radioactivité dans les cibles complexes, puis dans l'intensité globale d'une expérience d'hybridation moléculaire impose de créer des méthodes de correction (dit de « normalisation ») des données (Schuchhart *et al.*, 2000). Ces corrections sont d'autant plus importantes à mettre en plus que lors de notre expérimentation il nous a été impossible de quantifier l'incorporation de radioactivité.

La méthode couramment utilisée dans les autres techniques de mesure d'accumulation de transcrits (Northern-blots, RT-PCR) vise à choisir un ou plusieurs gènes, dits de ménage, dont l'accumulation des transcrits n'est pas sensée changer entre les différentes conditions étudiées, et de s'y référer. Il est alors possible, pourvu que des sondes correspondantes à des gènes de ménage soient présentes sur le filtre, de rapporter chaque hybridation à la valeur de ces gènes de ménage. Cette valeur est alors supposée être le reflet de la stabilité transcriptionnelle de ces gènes. Cependant, de tels gènes sont rarement insensibles à tous les traitements, et ainsi de nombreuses autres méthodes ne faisant pas référence à un étalon unique ont été développées.

Une solution est de mélanger la cible complexe à tester à un ARNm exogène dont la séquence homologie a été déposée au préalable en tant que sonde sur la puce. Les hybridations de chaque échantillon sont normalisées par rapport à cet étalon comme s'il s'agissait d'un échantillon contrôlé, mais avec l'avantage d'être totalement synthétique, ce qui permet une meilleure reproductibilité.

La plupart des auteurs choisissent de prendre comme base de référence à chaque hybridation un paramètre qui reflète au mieux la quantité totale de messagers présents dans la cible complexe, et effectivement disponibles à l'hybridation. Certains (Schuchhardt *et al.*, 2000 ; Zien *et al.*, 2001 ; Sterrenburg *et al.*, 2002) utilisent l'intégralité des signaux de sondes présentes sur les supports pour effectuer leurs normalisation. Différentes méthodes statistiques sont utilisées par la suite pour déterminer les biais expérimentaux et les corriger (Kroll et

Wolfl, 2002 ; Draghici *et al*, 2001, Yang *et al.*, 2002). La normalisation d'un filtre par la moyenne du signal total ne peut se faire que si le nombre de gènes analysés est grand, si la nature des gènes n'a pas un rapport direct avec les traitements et si les conditions analysées ne peuvent pas être à l'origine de dérégulations globales du transcriptome (Al Ghazi, 2003).

Au lieu de se baser sur les principes généraux de correction (normalisation), nous avons préféré identifier les effets induisant le maximum de variabilité, qui dans notre cas a été celui généré par la rétro-transcription. Une technique de correction adaptée à nos données a ainsi été mise en place.

Pour résumer, notre approche montre que tout plan d'expérience est particulier, que chaque hypothèse sous-jacente doit être vérifiée, et que les corrections à apporter sont singulières de chaque lot de données.

IV.3.2 Mise au point de critères de validation concernant le différentiel d'expression dans notre plan d'expérimentation

L'étape suivante a consisté à valider l'expression différentielle des gènes candidats issus de l'analyse *macro-arrays*. Ce projet a nécessité la mise en oeuvre d'un mode opératoire pratique et reproductible d'expériences en RT-PCR semi-quantitative (en l'absence de mise au point de la technique Q-PCR sur le site de la Réunion) afin de pouvoir effectuer des analyses statistiques sur les résultats obtenus. Cette approche a ainsi permis de définir un seuil de risque α à partir duquel il est possible sur les *macro-arrays* et dans nos conditions d'expérience de s'abstenir d'une validation par RT-PCR. Comme pour les *macro-arrays*, il est nécessaire ici de vérifier au préalable certaines hypothèses comme l'absence de points aberrants et la présence d'une courbe sigmoïde. Enfin, des analyses en Northern blot ont été testées pour valider le différentiel d'expression sur un autre stade de développement.

IV.3.2.1 Validation des résultats obtenus par RT-PCR et interprétation des paramètres d'ajustement

La RT-PCR permet d'analyser l'expression des gènes à la suite d'une amplification PCR spécifique d'un gène donné. La première étape d'une analyse de RT-PCR est de vérifier la bonne amplification de l'EST et d'exclure les résultats montrant un écart trop important à la courbe d'amplification de type $[Y=M/(1+e^{a(X-b)})]$. Si l'ajustement est différent de l'attendu, il est préconisé de refaire l'expérience. Enfin, le second intérêt de l'ajustement statistique à une sigmoïde réside dans l'interprétation biologique des paramètres M et b.

Pour une EST de même taille dans les deux ensembles comparés, l'amplification est sensée fournir une valeur maximale asymptotique M similaire pour les deux objets. C'est le cas avec le clone CA-S01_009_E01, où $M = 27811$ et $M = 27873$ respectivement pour les variétés B et BP (la différence est de 0,2%).

Le paramètre « b » montre aussi un intérêt biologique évident. Il correspond à l'abscisse du point d'intersection entre la sigmoïde et la droite $Y = M/2$. Les conditions PCR étant les mêmes, la valeur M identique pour BP et B est atteinte d'autant plus rapidement que le gène correspondant à l'EST est fortement exprimé. Les deux sigmoïdes sont seulement décalées dans le temps (nombre de cycles). Plus un gène est exprimé chez une variété et plus la valeur de « b » sera faible.

En revanche, le paramètre « a » varie uniquement en fonction de la taille du produit d'amplification et son interprétation ne présente aucun intérêt.

IV.3.2.2 Dispositif expérimental et analyse statistique en RT-PCR

Pour un nombre donné de cycles, ce sont jusqu'à huit prélèvements au cours des cycles pour chaque variété qui ont été effectués.

Les mélanges d'amplification n'ont jamais été disposés dans le même ordre dans la machine PCR ou sur les gels d'agarose. Des gradients peuvent en effet exister (Noirot, comm. pers).

IV.3.2.3 Les critères de validation des *macro-arrays*

Les dix EST retenues pour les RT-PCR ont auparavant montré à partir des *macro-arrays* des niveaux de risque α de première espèce compris entre $2,9 \cdot 10^{-2}$ (CA-S02_006_B04) et $9,3 \cdot 10^{-13}$ (CA-S02_003_E08). Dans le premier cas, une probabilité faible, mais non nulle (2,9%) existe de se tromper en affirmant la présence d'une différence d'expression entre B et BP d'après les données générées par *macro-arrays*. En revanche, nous avons une quasi-certitude d'avoir une réelle différence dans le second. Notre objectif a été d'établir le seuil α obtenu avec les *macro-arrays* à partir duquel il est inutile dans nos conditions d'expérience de valider par RT-PCR.

Sur les dix gènes testés par RT-PCR, le seul n'ayant pas confirmé le résultat obtenu par *macro-arrays* est celui pour lequel le risque α était maximal (2,9%). En conséquence, lorsque le test LSD corrigé par Bonferroni en *macro-arrays* donne un risque α inférieur à 10^{-3} , il est inutile d'opérer une seconde validation. La valeur critique proposée, valable pour notre

dispositif, devra être re-estimée pour tout autre dispositif. Pour résumer, il est toujours possible d'établir de tels critères et d'éviter ainsi des validations systématiques lorsque le dispositif expérimental et l'analyse statistique associée ne présentent pas de biais.

Enfin, le risque de se tromper en affirmant la présence d'une différence d'expression à la suite des deux tests statistiques indépendants (*macro-arrays* et RT-PCR) est égal à $P(A \text{ et } B) = P(A) \times P(B)$. Ainsi, pour l'EST CA-S02_005_F10 avec $P(A) = 0,018$ pour la RT-PCR et $P(B) = 1,81.10^{-4}$ pour le *macro-array*, la probabilité finale de se tromper est égale à $3,3.10^{-6}$. On a ainsi acquis une certitude quasi-absolue avec une vérification supplémentaire.

Des ratios BP/BR ont aussi été calculés pour les intensités de signaux obtenus en *macro-arrays* et en RT-PCR. Une forte relation existe entre les deux séries : l'une ou l'autre des méthodes peut ainsi être utilisée pour son estimation. En revanche, la valeur du ratio ne permet pas de prévoir si le différentiel d'expression va être significatif ou pas. Pour preuve, dans le cas de l'EST CA-S02_006_B04 (pas de différentiel significatif), le ratio moyen observé à la suite des deux expériences est de 0,70 et est similaire à celui de l'EST CA-S02_005_C02 (0,73), alors qu'ici la différence est hautement significative. Pourtant de nombreuses analyses se basent sur la valeur de ce ratio (Al Ghazi, 2003) comme critère de sélection. S'il est vrai que plus ce dernier est grand, plus le différentiel d'expression est observable sur gel d'agarose, il ne suffit pas à faire de l'inférence sur la réalité de ce différentiel d'expression.

Sur les 70 gènes présentant un différentiel d'expression entre les deux échantillons comparés lors de notre analyse *macro-arrays*, 29 ont une probabilité inférieure à 10^{-3} et ne nécessitent pas une vérification supplémentaire par RT-PCR semi-quantitative. Cette dernière est donc inutile pour 40% de ces gènes ce qui constitue un gain de temps non négligeable (Annexe 8).

IV.3.2.4 Validation en Northern Blot sur d'autres stades de développement

Les Northern Blots, comme toute méthode, nécessitent au moins deux répétitions, voire plus, lorsque la différence d'expression est faible. Cette technique coûteuse en ARN est ainsi difficilement applicable aux gènes à faible expression, en particulier lorsque l'échantillon est en quantité très limitante (pistil d'*Arabidopsis* par exemple). Les Northern Blots sont ainsi difficiles à appliquer à un grand nombre de gènes candidats.

Aux stades 2 et 7 de feuilles, utilisés pour les Northern, seuls deux gènes présentant des ratio d'expression BP/B *macro-arrays* inférieurs à 0,36 ont pu être validés, tandis que les gènes pour lesquels les ratio BP/B étaient supérieurs à 0,56 ont donné des résultats incertains. Plusieurs hypothèses peuvent ici être émises, entre autres : 1) cette technique est moins sensible que les autres car elle ne permet pas de confirmer des résultats significatifs obtenus à la fois par *macro-arrays* et par RT-PCR sur le stade 4 de feuilles. Il faut d'ailleurs préciser qu'en *macro-arrays* la sonde (fixe) est pure, en Northern la cible (fixe) est complexe, et peut plus facilement fixer différentes isoformes, 2) le différentiel d'expression mis en évidence par *macro-arrays* n'est valable que sur un stade de développement donné (stade 4) et disparaît au cours du développement, 3) le différentiel d'expression mis en évidence est valable uniquement dans la comparaison des deux stocks d'ARNm utilisés, 4) existence d'isoformes différentiellement exprimées d'un même type de gène.

IV.3.3 Gènes différentiellement exprimé chez le « mutant » *Laurina*

Après l'application des techniques SSH et *macro-arrays*, certains gènes sont apparus comme exprimés différemment entre B et BP. Le fait que la mutation *Laurina*, bien que ponctuelle, agisse en cascade sur la régulation transcriptionnelle d'un grand nombre de gènes a été à l'origine de leur recherche. La diversité des fonctions assignées par Blast aux ESTs estimées différentiellement exprimées illustre bien les effets pléiotropiques de la mutation *Laurina*. Seulement trois hypothèses sont alors possibles :

1/ les gènes ne sont différentiellement exprimés qu'entre les ARN-source, c'est à dire ceux provenant de l'extraction au stade 4 (ayant servi à la fois aux hybridations *macro-arrays* et à la vérification en RT-PCR) de la surface aérienne foliaire d'échantillons de la serre de Montpellier,

2/ les gènes sont différentiellement exprimés uniquement au stade 4. Le différentiel est transitoire. Il y a eu en effet peu de relation entre la SSH d'origine et la sur-expression détectée en *macro-arrays*. Dans ce cas, il est supposé que des gènes isolés dans SSHbp (stade cotylédonaire) sont parfois sur-exprimés chez le Bourbon au stade 4, ou inversement.

3/ l'expression des gènes est bien due à la mutation. Dans ce dernier cas, seuls les gènes retrouvés dans une banque et surexprimés avec la cible du même type (ex : SSHbp et cible BP) pourraient être concernés. Ce serait alors deux ESTs pour le BP et neuf pour le B (Tableau III.16). Le différentiel d'expression de ces gènes reste à vérifier à partir d'autres échantillons : 1/ ceux issus des neufs prélèvements de la serre de Montpellier, permettant de

Tableau III.16 : ESTs dont le différentiel d'expression est similaire entre la technique SSH et la technique *macro-array* couplée à la vérification en RT-semi quantitative.

Spot label	Bonnifori	EST	Ratio BP/B	SSH
CA-S01_012_G04	<10-8	Pas valide	2,924	BP
CA-S01_010_H02	<10-8	specific tissue protein 2	2,101	BP
CA-S02_001_G06	<10-8	mRNA for hydroxyproline-rich glycoprotein	0,703	BR
CA-S02_002_B06	<10-8	Pas valide	0,660	BR
CA-S02_003_E08	<10-8	vacuolar processing enzyme-1b	0,650	BR
CA-S02_001_B12	0,000040	Pas de hit	0,744	BR
CA-S02_009_D09	0,000176	Pas valide	0,780	BR
CA-S02_005_F10	0,000181	NADH dehydrogenase subunit J	0,771	BR
CA-S02_006_E06	0,000213	Pas valide	0,739	BR
CA-S02_004_F07	0,000468	peroxidase	0,794	BR
CA-S02_005_C02	0,000906	Pas de hit	0,808	BR

surcroît d'analyser l'expression dans des organes différents (parties aériennes et racines au moins) et 2/ d'échantillons prélevés directement en champs à l'île de la Réunion.

Il serait nécessaire aussi de ré-envoyer à séquencer tous les gènes d'intérêt qui n'ont pu l'être au cours de la première vague de séquençage massive des banques (comme par exemple CA-S01_012_G04 qui ressort différentiellement surexprimé chez BP en *macro-arrays* et en RT-PCR, et qui est issu de la banque SSHbp).

Enfin, en dernier lieu, nous pouvons discuter sur la pertinence des échantillons utilisés. En effet, nous avons voulu comparer les transcriptomes du Bourbon et du Bourbon pointu à un stade précoce, afin de cibler les premiers effets de la mutation *Laurina*. Pour ce faire, les banques soustraites ont été construites à partir de la partie aérienne de plantules à un stade de développement post-cotylédonaire, correspondant au stade d'émission des deux premières feuilles au dessus des cotylédons. La vérification du différentiel d'expression des ESTs de ces banques a été faite par *macro-arrays* et RT-semi-quantitative à partir d'ARN extraits de la partie aérienne de plantules d'un mois plus âgées, ou jusqu'à quatre mois plus âgées pour les Northern. Les parties aériennes incluaient alors des tiges et des pétioles en quantité non négligeables. Hors les gènes ne s'expriment pas de la même façon dans les différents organes (Adams *et al.*, 2003 ; Rosahl *et al.*, 1985 ; McClure et Guilfoyle, 1989). Ainsi, il est possible que le différentiel d'expression d'un gène puisse être détecté dans la partie aérienne du stade 2 (composée majoritairement en masse de feuilles) sans l'être dans les prélèvements effectués ultérieurement. Il aurait peut-être fallu au dessus du stade post-cotylédonaire, séparer les différents organes. Une autre alternative aurait été de ne prélever que les derniers entre-nœuds émis et l'apex afin de se retrouver dans les conditions « d'initiation » et de « mises en place des organes » comme lors du stade post-cotylédonaire.

Conclusions et perspectives

« Le café est très en usage à Paris : il y a un grand nombre de maisons publiques où on le distribue. Dans quelques-unes de ces maisons, on dit des nouvelles ; dans d'autres, on joue aux échecs. Il y en a une où l'on apprête le café de telle manière qu'il donne de l'esprit à ceux qui en prennent : au moins, de tous ceux qui en sortent, il n'y a personne qui ne croie qu'il en a quatre fois plus que lorsqu'il y est entré ». (Montesquieu (1689-1755), Lettres persanes Lettre XXXVI. Usbeck a Rhedi.)

CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES

L'objectif de cette thèse était de caractériser et de tenter de comprendre les effets de la mutation naturelle nommée *Laurina* chez *Coffea arabica* var. Bourbon. La synthèse bibliographique (en partie I) a présenté les diverses possibilités permettant d'étudier une mutation naturelle. Nous avons alors décidé de caractériser certains des effets de cette mutation, selon deux approches très différentes mais complémentaires : i) caractérisation histo-morphologique des phénotypes ; ii) étude comparative du transcriptome, des parties aériennes. Après avoir résumé et discuté brièvement les résultats obtenus de ces deux approches, nous présentons, dans cette dernière partie, quelques perspectives de ces travaux.

La première approche nous a permis de mettre en évidence certains effets de la mutation au niveau histo-morphologique, et de les relier entre eux : des analyses précises des modifications induites lors d'un plastochrone, au niveau de l'apex, et lors de la croissance des entre-nœuds ont conduit à caractériser des phénomènes cellulaires à l'origine du nanisme ainsi que les processus induisant l'architecture en « sapin de Noël » des plants de Bourbon pointu.

Ainsi, les mesures de croissance végétative ont permis de décrire et d'expliquer la forme pyramidale du mutant. Les différences morphologiques entre B et BP sont expliquées en grande partie par un rythme de croissance différent entre les axes plagiotropes et l'axe orthotrope. Si la longueur des entre-nœuds plagiotropes est plus réduite chez BP, leur croissance étalée sur trois plastochrones ne semble pas touchée, ce qui n'est pas le cas pour ceux de l'axe orthotrope puisqu'ils atteignent leur taille finale quasiment en un plastochrone.

En matière d'étude histologique, l'origine du nanisme a été recherchée à deux niveaux. Tout d'abord dans l'apex, centre initiateur des organes aériens. Ainsi les deux principaux effets de la mutation *Laurina* à ce niveau portent : i) sur la précocité de son action sur le plastochrone et, ii) sur sa localisation au niveau des méristèmes foliaires et des cellules souches du jeune entre-nœud. Chez le Bourbon pointu, les primordiums et les ébauches foliaires sont plus réduits, conduisant en fin de croissance à des feuilles plus petites et des entre-nœuds plus courts. Par ailleurs, au niveau des entre-nœuds de l'axe orthotrope, deux autres phénomènes permettent aussi d'expliquer le nanisme: 1) les cellules sont plus petites chez le Bourbon pointu, 2) les cellules y sont aussi moins nombreuses. Ainsi chez le Bourbon, la croissance de la tige est déterminée d'abord par la division cellulaire (mère) au niveau du dernier entre-nœud émis, puis par

l'élongation cellulaire (auxèse), correspondant à une cinétique classique de croissance. Chez le Bourbon pointu, la croissance des entre-nœuds est essentiellement due à la mèresè, l'auxèse étant quasi-inexistante, et ce chez les deux derniers entre-nœuds émis. Une analyse plus fine a permis de conclure que le nombre de cellules (mèresè) est le facteur contribuant le plus à la longueur finale de l'entre-nœud.

A l'instar de ce nous avons pu mettre en évidence chez l'axe orthotrope, une étude comparative des caractéristiques associées à la mèresè et à l'auxèse, au niveau des axes plagiotropes, apporterait des informations complémentaires permettant de mieux expliquer l'ensemble des modifications de l'architecture, chez le « mutant » Bourbon pointu. L'intégration de l'ensemble de ces analyses pourrait alors aboutir à une modélisation de la croissance de l'arbuste.

Suite à l'application de GA, les réponses morpho-physiologiques chez Bourbon sont celles attendues. Ce n'est pas le cas chez le Bourbon pointu. Ce dernier n'est pourtant pas un mutant insensible à l'action de GA exogène. L'absence d'effet au niveau du plastochrone en est la réponse la plus surprenante. Nos résultats indiquent ainsi que la diminution du plastochrone et l'accroissement de la taille de l'entre-nœud seraient en fait deux phénomènes non liés, différemment touchés par la GA exogène. Cette hormone agirait, au moins, à deux niveaux : 1) dans la zone subapicale méristématique en induisant l'accroissement de la taille de l'entre-nœud ; 2) dans le méristème apical caulinaire, où la diminution du plastochrone se répercute. En résumé, selon le territoire du méristème apical caulinaire considéré, la mutation *Laurina* engendrerait des réponses classiques ou au contraire inattendues aux gibberelins.

Ces études macro- et microscopiques ont été couplées, au niveau moléculaire, à la recherche de gènes différentiellement exprimés entre Bourbon et Bourbon pointu. Cette seconde approche a ainsi permis d'analyser un certain nombre de différences induites par la mutation, au niveau du transcriptome des parties aériennes. Cette étude a été réalisée au stade le plus précoce possible de développement des jeunes plants, au moment où les toutes premières différences phénotypiques ont pu être visuellement observées. Ce choix a été déterminé par le fait que nous souhaitons ainsi bénéficier des effets les plus « primaires » possibles de la mutation, menant aux effets pléiotropiques observés.

Au vu des nombreuses modifications phénotypiques caractéristiques de Bourbon pointu, *a priori* de nombreux gènes devraient voir leur expression modifiée par la mutation. En fait, le nombre de gènes potentiellement différentiellement exprimés s'est révélé moindre que celui attendu. Sur les 2302 gènes répertoriés, issus des banques soustractives, 70 d'entre eux ont été retenus pour leur expression différentielle entre le Bourbon et le Bourbon pointu, sans qu'aucun d'eux n'ait montré un différentiel d'expression très important entre les deux variétés. Ceci pourrait être en partie dû aux critères statistiques très « conservateurs » utilisés pour notre tri.

Une des propriétés connues du type de banque soustractive, que nous avons mis en œuvre, se traduit par un nombre souvent important de faux-positifs (Ji *et al.*, 2002), surtout lorsque les différentiels d'expression sont faibles. Ce phénomène peut aussi expliquer le faible ratio de gènes potentiellement candidats observé (70/2302). Enfin, les méthodes comme les *macro-arrays* ou la RT-PCR semi-quantitative ne sont pas suffisamment performantes pour les gènes faiblement exprimés. Mener une approche gène-candidat par Q-PCR est une autre perspective de cette étude, plus performante pour l'étude de gènes, que l'on suppose dès lors faiblement exprimés.

Par ailleurs, il est également possible d'envisager que la mutation *Laurina* puisse agir essentiellement au niveau du système de la traduction des protéines, ou encore au niveau de leur maturation, voire de leur régulation (phosphorylation, etc.). Dans ces cas là, une étude du protéome et du métabolome pourrait permettre de faire ressortir des différences variétales plus évidentes.

Concernant l'ensemble de 70 gènes potentiellement candidats révélés par nos analyses en *macro-array*, il serait d'ailleurs important de valider ce différentiel sur d'autres échantillons (comme de nouveaux prélèvements aux stades de maturation étudiés, ou sur des organes bien ciblés) et de comprendre ce qui peut les relier les uns aux autres, comme caractériser les promoteurs et les zones conservées qui leur appartiennent.

Dans notre cas, l'approche transcriptomique « en aveugle » (banques soustraites puis analyse *macro-arrays* sur l'ensemble des ESTs) ne s'est donc pas avérée très probante. Une fois la caractérisation histo-morphologique de la mutation complétée, suivie d'analyses plus poussées au niveau hormonal, une approche « spécifique » pourrait s'avérer plus pertinente. Ainsi, au lieu de chercher à analyser massivement le transcriptome, un crible préalable de gènes choisis pour leur implication dans les différences phénotypiques précoces observées (nanisme, etc.), puis leur

étude fine peut aussi constituer une alternative. Cette approche pourrait être mise en place en utilisant comme base les banques soustraites construites au cours de la thèse, mais aussi à partir des gènes (*Wu*, *Clv*, *Ant*, ...) supposés être impliqués lors de notre étude sur les effets de la mutation au niveau phénotypique (discussion du chapitre II). Il serait intéressant d'en comparer l'expression chez le Bourbon et le Bourbon pointu et de faire ainsi le lien entre les approches histo-morphologique et transcriptomique de la caractérisation de la mutation *Laurina*.

Enfin, le séquençage d'ESTs à partir de nos banques soustraites indique un ratio d'abondance de gènes impliqués dans le métabolisme carbohydrates/lipides différenciant les jeunes plants de Bourbon et de Bourbon Pointu. Ce ratio peut être l'une des caractéristiques liées à la mutation, s'exprimant dans les cellules quel que soit l'organe (partie aérienne ou fruit) et leur développement physiologique. La qualité future des grains s'expliquerait alors par une modification des orientations métaboliques, existant déjà dans les tissus de la partie aérienne de la jeune plante. De ce point de vue, il serait intéressant d'étudier l'expression de ces gènes et de la relier à un dosage de lipides, sucres et certains métabolites secondaires (comme les acides chlorogéniques) dans les grains, comme dans les feuilles.

Pour conclure, l'ensemble de nos résultats aboutit à l'hypothèse de perturbations dans la cascade de réponses à une hormone ou un messager secondaire. Tout au long du chapitre II, l'hypothèse portant sur l'implication d'une modification de la balance hormonale chez le Bourbon pointu, par la mutation *Laurina*, a été soulevée. Une surproduction d'auxine chez le Bourbon pointu est l'hypothèse forte issue des expériences portant sur l'application de GA exogène par exemple. Doser les formes actives et inactives de plusieurs hormones dans des organes bien ciblés comme les jeunes feuilles, les entre-noeuds et les apex peut apporter certains éléments de réponse. L'étude de l'expression de gènes-clés de leurs voies de synthèse, trouvés pour certains dans nos banques soustraites, permettrait très probablement de mieux comprendre les effets de la mutation *Laurina*. Toutes ces études, et les informations peu à peu intégrées, pourraient aboutir à une véritable caractérisation moléculaire de cette mutation, un des objectifs initiaux du projet.

Références bibliographiques

Le succès de l'introduction du café en Europe est tel qu'à l'époque, certains religieux italiens ont demandé son excommunication, pensant qu'il ne pouvait être que l'œuvre du diable. Le pape Clément VIII (1592-1605) a proposé de le faire baptiser afin d'en faire un vrai breuvage chrétien !

Références numérotées dans le texte concernant des archives, classés par ordre croissant de leurs numéros

1) Le grand livre de la Réunion Volume 1 des origines à 1848, Orphie, 2003, par D. Vaxelaire. 352 pages. Collection Le Grand livre

2) Le Mémorial de la Réunion, Direction Henri Maurin et Jacques Lentge, TOME I des origine à 1767, Australe editions, imprimé par Cape et transvaal Printers Ltd Cape Town South Africa, 1979, 512pages.

(3) Ponchartrain au capitaine de l'Auguste, au commissaire ordonnateur Lempereur et aux directeurs de la Compagnie (archives du ministères de la marine aux archives nationales, série B² –correspondance, lettres envoyées- 239 –ordres pour le transport de caféiers de Moka et pour la prise de possession de Maurice, folio 289, 288 verso et 299).

4) Archives du Ministeres de la France d'Outre mer aux archives nationales. Série C (Correspondance générale. Lettres recues), C⁴,pieces 1 et 2).

5) Le Mémorial de la Réunion, Direction Henri Maurin et Jacques Lentge, TOME I des origine à 1767, Australe editions, imprimé par Cape et transvaal Printers Ltd Cape Town South Africa, 1979, 512pages.

6) Mémoire de M. Louis Boyvin d'Hardancourt, ancien directeur de la compagnie des indes orientales, depuis son établissement par édit du mois d'aout 1664, et ce qu'il s'est passé depuis sa régie jusques à sa réunion à celle d'Occident par édit du mois de mai 1719 et années postérieures, déclarations et arrêts qui la concernent et différents mémoires ». 414p. pages 364 à 365dans les archives du ministère de la Guerre à Vincennes, volume A¹2565.

7) Pontchartrain aux directeurs de la Compagnie des indes. Versaille, 5 juillet 1713, pour leur transmettre ladite lettre du « roi » de Moka. Archives du ministères de la marine aux archives nationales, série B² –correspondance, lettres envoyées- 235 –opportunité de s'établir à Maurice, folio 53

8) Résumé de la lettre de lempereur au conseil de la marine dans Archives du ministère de la marine aux archives nationales, série B¹ –décisions- 14 –délibérations du conseil de marine touchant la réorganisation de Bourbon en 1717- folio 31verso.

9) Mémoire de M. Louis Boyvin d'Hardancourt, ancien directeur de la compagnie des indes orientales, depuis son établissement par édit du mois d'aout 1664, et ce qu'il s'est passé depuis sa régie jusques à sa réunion à celle d'Occident par édit du mois de mai 1719 et années postérieures, déclarations et arrêts qui la concernent et différents mémoires ». 414p. dans les archives du ministère de la Guerre à Vincennes, volume A¹2565.

10) Mémoire sur l'isle Bourbon remis en 1717 par les directeurs aux nouveaux administrateurs (Archives du ministeres de la France d'Outre mer aux archives nationales. Série C (Correspondance générale. Lettres recues), C³,piece 3).

11) Albert Lougnon. L'île Bourbon pendant la régence. L'aventure du café au temps des forbans. Editions Larose-Paris. 342pages.

12) "L'île Bourbon pendant la Régence. Desforges-Boucher : les débuts du café" par Albert Lougnon (thèse principale présentée à la Faculté des lettres de l'Université de Paris, 1956

13) Lettre de Justamond du 19 septembre 1717. Citée par Pierre Margry dans son étude sur les Oles de France et de Bourbon sous le gouvernement de mahé de la Bourdonnais, *revu maritime et coloniale*, octobre 1862, pages 340-341.

14) Calculs fait par Guêt M.I. Les origines de l'île Bourbon et de la colonisatio, française à Madagascar. Paris, nouvelle édition, Bayle, 1888, XLVII-303 pages.

15) Mémoire de M. Louis Boyvin d'Hardancourt, ancien directeur de la compagnie des indes orientales, depuis son établissement par édit du mois d'aout 1664, et ce qu'il s'est passé depuis sa régie jusques à sa réunion à celle d'Occident par édit du mois de mai 1719 et années postérieures, déclarations et arrêts qui la concernent et différents mémoires ». 414p. pages 364 - 365 dans les archives du ministère de la Guerre à Vincennes, volume A¹2565.

16) Archives départementales de La Réunion, fonds de la Compagnie des Indes. Série C°, f°32.

17) Relation de Guy le Gentil de la Barbinais, passager à bord du Jupiter, dans Albert Lougnon, *Voyage anciens à l'île Bourbon. Relations glanées à travers l'imprimé et colligées avec dix illustrations en hors-texte. Première série. Sous le signe de la tortue. Tananarive, imprimerie de l'Imeria, 1939, in-8° VIII, 233 pages, 10 hors texte.*

18) Calculs fait par Guêt M.I. Les origines de l'île Bourbon et de la colonisation, française à Madagascar. Paris, nouvelle édition, Bayle, 1888

19) Le Mémorial de la Réunion, Direction Henri Maurin et Jacques Lentge, TOME I des origine à 1767, Australe editions, imprimé par Cape et transvaal Printers Ltd Cape Town South Africa, 1979, 512pages

20) Ordonnance du Conseil supérieur de Bourbon, 1^{er} décembre 1724 Archives départementales de La Réunion, fonds de l compagnie des Indes. Série C°

21) lettres des directeurs de la Compagnie au conseil supérieur de Bourbon du 10 octobre 1725. Correspondance du Conseil supérieur de Bourbon et de la Compagnie des Indes (10 mars 1732 -23 janvier 1736), vol2, Saint Denis, 1933.

22) lettre de la compagnie au Conseil supérieur de Bourbon du 23 octobre 1730. Correspondance du Conseil supérieur de Bourbon et de la Compagnie des Indes (10 mars 1732 -23 janvier 1736), vol2, Saint Denis, 1933.

23) lettres des directeurs de la Compagnie au conseil supérieur de Bourbon du 17 novembre 1732. Correspondance du Conseil supérieur de Bourbon et de la Compagnie des Indes (10 mars 1732 -23 janvier 1736), vol2, Saint Denis, 1933.

24) lettres des directeurs de la Compagnie au conseil supérieur de Bourbon du 11 décembre 1734. Correspondance du Conseil supérieur de Bourbon et de la Compagnie des Indes (10 mars 1732 -23 janvier 1736), vol2, Saint Denis, 1933.

25) Lougnon Albert, le mouvement maritime aux îles de Bourbon et de France pendant les premières années du règne personnel de Louis XV (1727-1735), Nérac, 1958.

26) Voyages aux colonies orientales, lettres écrites à M. Le Comte de Montalivet, ancien ministre de l'intérieur pendant les années 1817 à 1820. Edité par ARS TERRES CREOLES. 1990

27) A.Jacotot La culture du café. Son avenir dans les colonies françaises, thèse de droit, Paris 1910.

- 28) « L'île de La Réunion, étude de géographie humaine citée ds Le café de la Réunion, une « civilisation » disparue. Par Claude Wanquet dans Fragments pour une histoire des économies et sociétés de plantation à la Réunion. Publications de l'université de la Réunion. 352p
- 29) Annuaire de La Réunion, 1854 et 1857, Archives départementales de la Réunion, A4.
- 30) LEB 199 Archives départementales de la Réunion. Collection M. et A. Lebond. Notes et correspondance de Joseph Hubert 2 Août 1820
- 31) Album de l'île de la Réunion. Souvenirs de l'île Bourbon. Intégralité de textes et d'illustrations d'après l'édition originale en 4 volumes de 1878-1883. Antoine Roussin. Orphie.
- 32) Album de l'île de la Réunion. Souvenirs de l'île Bourbon. Intégralité de textes et d'illustrations d'après l'édition originale en 4 volumes de 1878-1883. Antoine Roussin. Orphie.
- 33) LEB 199 Archives départementales de la Réunion. Collection M. et A. Lebond. Notes et correspondance de Joseph Hubert 2 Aout 1820
- 34) Billiard Antoine. Voyages aux colonies orientales, lettres écrites à M. Le Comte de Montalivet, ancien ministre de l'intérieur pendant les années 1817 à 1820. Edité par ARS TERRES CREOLES. 1990
- 35) Raoul Culture du Caféier 1894
- 36) Billiard Antoine. Voyages aux colonies orientales, lettres écrites à M. Le Comte de Montalivet, ancien ministre de l'intérieur pendant les années 1817 à 1820. Edité par ARS TERRES CREOLES. 1990
- 37) Album de l'île de la Réunion. Souvenirs de l'île Bourbon. Intégralité de textes et d'illustrations d'après l'édition originale en 4 volumes de 1878-1883. Antoine Roussin. Orphie.
- 38) (LEB 199 Archives départementales de la Réunion. Collection M. et A. Lebond. Notes et correspondance de Joseph Hubert 2 Aout 1820
- 39) Auguste De Villèle. L'origine du café Leroy ou [Bourbon] pointu. Revue agricole de la Réunion. Novembre 1920
- 40) Auguste De Villèle. L'origine du café Leroy ou [Bourbon] pointu. Revue agricole de la Réunion. Novembre 1920

Autres références du texte, classées par ordre alphabétique

A

Adams KL, Cronn R, Percifield R, Wendel JL. 2003. Genes duplicated by polyploidy show unequal contributions to the transcriptome and organ-specific reciprocal silencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 4649-4654.

Aharoni A, Keizer LC, Bouwmeester HJ, Sun Z, Alvarez-Huerta M, Verhoeven HA, Blaas J, van Houwelingen AM, De Vos RC, van der Voet H, Jansen RC, Guis M, Mol J, Davis RW, Schena M, van Tunen AJ, O'Connell AP. 2000. Identification of the SAAT gene involved in strawberry flavor biogenesis by use of DNA microarrays. *Plant Cell* **12**: 647-662

Aharoni A, Vorst O. 2002. DNA microarrays for functional plant genomics. *Plant Molecular Biology* **48**: 99-118

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. 2002. *Molecular Biology of the cell, 4th edn.* New-York

Al-Ghazi Y, Muller B, Pinloche S, Tranbarger TJ, Nacry P, Rossignol M, Tardieu F, Doumas P. 2003. Temporal responses of Arabidopsis root architecture to phosphate starvation: evidence for the involvement of auxin signalling. *Plant, Cell et Environment* **26**: 1053-1056

- Alonso-Blanco C, Koornneef M. 2000.** Naturally occurring variation in Arabidopsis: an underexploited resource for plant genetics. *Trends Plant Sci* **5**: 22-29
- Alpert KB, Grandillo S, Tanksley SD. 1995.** *fw 2.2*: a major QTL controlling fruit weight is common to both red- and green-fruited tomato. *Theor Appl Genet* **91**: 994-1000
- An H, Roussot C, Suarez-Lopez P, Corbesier L, Vincent C, Pineiro M, Hepworth S, Mouradov A, Justin S, Turnbull C, Coupland G. 2004.** CONSTANS acts in the phloem to regulate a systemic signal that induces photoperiodic flowering of Arabidopsis. *Development* **131**: 3615-3626
- Anderson JA, Ogihara Y, Sorrells ME, Tanksley SD. 1992.** Development of a chromosome arm map for wheat based on RFLP markers. *Theor Appl Genet* **83**: 1035-1043
- Anthony F. 1992.** *Les ressources génétiques des caféiers : collecte, gestion d'un conservatoire et évaluation de la diversité génétique*. Paris: ORSTOM. 320 pp.
- Anthony F, Clifford MN, Noirot M. 1993.** Biochemical diversity in the genus *Coffea* L.: chlorogenic acids, caffeine, and mozambioside contents. *Genetic Resources and Crop Evolution* **40**: 61-70.
- Anthony F, Combes MC, Astorga C, Bertrand B, Graziosi G, Lashermes P. 2002a.** The origin of cultivated *Coffea arabica* L. varieties revealed by AFLP and SSR markers. *Theoretical and applied Genetics* **104**: 894-900
- Anthony F, Quiros O, Topart P, Bertrand B, Lashermes P. 2002b.** Detection by simple sequence repeat markers of introgression from *Coffea canephora* in *Coffea arabica* cultivars. *Plant Breeding* **121**: 542-544
- Aronel V, Lemieux B, Hwang I, Gibson S, Goodman HM, Somerville CR. 1992.** Map-based cloning of a gene controlling omega-3 fatty acid desaturation in Arabidopsis. *Science* **258**: 1353-1355
- Asami T, Nakano T, Fujioka S. 2005.** Plant brassinosteroid hormones. *Vitam Horm* **72**: 479-504
- Autran D, Trass J. 2001.** Organisation et fonctionnement des cellules souches végétales: Le méristème apical d'Arabidopsis. *Médecine/sciences* **17**: 836-844
- Avery AG, Satina S, Rietsema J. 1959.** *Blakeslee: The Genus Datura*. New-York: The Ronald press company
- Azpiroz R, Wu Y, LoCascio J, Feldmann K. 1998.** An Arabidopsis Brassinosteroid-Dependent Mutant Is Blocked in Cell Elongation. *Plant cell* **10**: 219-230
- Azpiroz-Leehan R, Feldmann KA. 1997.** T-DNA insertion mutagenesis in Arabidopsis: going back and forth. *Trends Genet* **13**: 152-156

B

- Bachem CW, van der Hoeven RS, de Bruijn SM, Vreugdenhil D, Zabeau M, Visser RG. 1996.** Visualization 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
- Barbot W, Dupressoir A, Lazar V, Heidmann T. 2002.** Epigenetic regulation of an IAP retrotransposon in the aging mouse: progressive demethylation and de-silencing of the element by its repetitive induction. *Nucleic Acids Res* **30**: 2365-2373
- Bastow R, Mylne JS, Lister C, Lippman Z, Martienssen RA, Dean C. 2004.** Vernalization requires epigenetic silencing of FLC by histone methylation. *Nature* **427**: 164-167
- Bataillon, 2000.** *Mutation Spontanée et Gestion des Ressources Génétiques: Approches Théorique & Expérimentale sur le Blé Dur (Triticum durum)*. Institut National Agronomique, Paris.
- Beaumont JH. 1939.** An analysis of growth and yield relationships of coffee trees in the Kona District, Hawaii. *Journal of Agricultural Research, Washington, D.C.* **59**: 223-235
- Beavis WD, Grant D, Albertsen M, Fincher R. 1991.** Quantitative trait loci for plant height in four maize populations and their associations with qualitative genetic loci. *Theoretical and Applied Genetics* **83**: 141-145
- Beecher CWW. 2003.** The human metabolome. In: Harrigan GG and Goodacre R, ed. *Metabolic Profiling- Its Role in Biomarker Discovery and Gene Function Analysis*. Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers Group, pp335.

- Belhassen E, Dommée B, Atlan A, Gouyon PH, Pomente D, Assouad MW, Couvet D. 1991.** Complex determination of male sterility in *Thymus vulgaris* L.: genetic and molecular analysis. *Theor Appl Genet*: 137-143
- Berthaud J. 1980.** L'incompatibilité chez *C. canephora*: méthode de test et déterminisme génétique. *Café Cacao Thé* **24**: 267-274
- Berthou F, Trouslot P, Hamon S, Vedel F, Quetier F. 1980.** Analyse en électrophorèse du polymorphisme biochimique des caféiers: variation enzymatique dans dix-huit populations sauvages / Variations de l'ADN mitochondrial dans les espèces: *C. canephora*, *C. eugenioides* et *C. arabica*. *Café Cacao Thé* **24**: 313-326
- Berthou F, Mathieu C, Vedel F. 1983.** Chloroplast and mitochondrial DNA variation as indicator of phylogenetic relationships in the genus *Coffea* L. *Theoretical and Applied Genetics* **65**: 77-84
- Bertucci F, Bernard K, Loriod B, Chang YC, Granjeaud S, Birnbaum D, Nguyen C, Peck K, Jordan BR. 1999.** Sensitivity issues in DNA array-based expression measurements and performance of nylon microarrays for small samples. *Hum Mol Genet* **8**: 1715-1722
- Bestor TH, Tycko B. 1996.** Creation of genomic methylation patterns. *Nat Genet* **12**: 363-367
- Bielenberg DG, Wang Y, Fan S, Reighard GL, Scorza R, Abbott AG. 2004.** A Deletion Affecting Several Gene Candidates is Present in the Evergrowing Peach Mutant. *Journal of Heredity* **95**: 436-444
- Bishop GJK, Harrison K, Jones JDG. 1996.** The tomato *Dwarf* gene isolated by heterologous transposon tagging encodes the first member of a new cytochrome P450 family. *The Plant Cell* **8**: 959-969
- Blakeslee AF, Avery BT. 1919.** Mutations in the Jimson weed. *Journal of Heredity* **10**: 111-120
- Blakeslee AF, Belling J. 1924.** Chromosomal chimeras in the Jimson weed, *Datura stramonium*. *Journal of Heredity* **15**: 195-206
- Blaser HW, Einset J. 1948.** Leaf Development in Six Periclinal Chromosomal Chimeras of Apple Varieties. *American Journal of Botany* **35**: 473-482
- Blaser HW, Einset J. 1950.** Flower Structure in Periclinal Chimeras of Apple. *American Journal of Botany* **37**: 297-304
- Blazquez MA, Weigel D. 1999.** Independent regulation of flowering by phytochrome B and gibberellins in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **120**: 1025-1032
- Bollmann J, Carpenter R, Coen ES. 1991.** Allelic interactions at the nivea locus of *Antirrhinum*. *Plant Cell* **3**: 1327-1336
- Bouharmont J. 1959.** *Recherches sur les affinités chromosomiques dans le genre Coffea*. Bruxelles. 94 pp.
- Bouharmont J. 1963.** Somatic chromosomes of *Coffea* species. *Euphytica* **12**: 254-257
- Brian PW, Hemming HG. 1955.** The effect of gibberellic acid on shoot growth of pea seedlings. *Physiol. Plant.* **8**: 669-681
- Bridson D, Verdcourt B. 1988.** *Coffea*. In: Polhill RM and Baljema AA, ed. *Flora of Tropical East Africa; Rubiaceae (Part 2)*. Rotterdam, 703-723.
- Bridson DM. 1986.** Nomenclatural notes on *Psilanthus*, including *Coffea* sect. *Paracoffea* (*Rubiceae* tribe *Coffea*). *Kew Bulletin* **42**: 453-460
- Brink RA. 1958.** Paramutation at the R locus in maize. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **23**: 379-391
- Brink RA, Styles ED, Axtell JD. 1968.** Paramutation: directed genetic change. Paramutation occurs in somatic cells and heritably alters the functional state of a locus. *Science* **159**: 161-170
- Brodersen P, Petersen M, Pike HM, Olszak B, Skov S, Odum N, Jorgensen LB, Brown RE, Mundy J. 2002.** Knockout of *Arabidopsis* accelerated-cell-death11 encoding a sphingosine transfer protein causes activation of programmed cell death and defense. *Genes Dev* **16**: 490-502
- Brown CL, Sommer HE. 1992.** Shoot growth and histogenesis of trees possessing diverse patterns of shoot development. *American Journal of Botany* **79**: 335-346
- Brown CL, Sommer HE, Wetzstein HY. 1994.** Morphological and histological differences in the development of dwarf mutants of sexual and somatic origin in diverse woody taxa. *Trees - Structure and Function* **9**: 61-66

- Brown CS, Goodwin PC, Sorger PK. 2001.** Image metrics in the statistical analysis of DNA microarray data. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 8944-8949
- Busov V, Meilan R, Pearce DW, Rood SB, Ma C, Tschaplinski TJ, Strauss SH. 2006.** Transgenic modification of *gai* or *rgl1* causes dwarfing and alters gibberellins, root growth, and metabolite profiles in *Populus*. *Planta* **224**: 288-299
- Buvat R. 1952.** Structure, évolution et fonctionnement du méristème apical de quelques Dicotylédones. *Ann Sci Nat Bot, 11ème série.* **13**: 199-300
- Buvat R. 1955.** Le méristème apical de la tige. *Année Biol.* **31**: 596-656
- Buvat R. 1989.** *Ontogeny, cell differentiation and structure of vascular plants*. Berlin, New-York: Springer Verlag. 581 pp.
- Bytof G, Selmar D, Schieberle P. 2000.** New aspects of coffee processing: how do the different post harvest treatments influence the formation of potential flavour precursors? *Journal of applied botany* **74**

C

- Campa C, Doulbeau S, Dussert S, Hamon S, Noirot M. 2005.** Diversity in bean Caffeine content among wild *Coffea* species: Evidence of a discontinuous distribution. *Food chemistry* **91**: 633-637
- Carvalho A. 1946.** Distribuição geográfica e classificação botânica do gênero *Coffea* com referência especial à espécie *Arabica*. V. origem e classificação botânica do *C. arabica* L. *Boletim da Superintendência dos Serviços do Café* **21**: 174-180
- Carvalho A, Ferweda F, Frahm-Leliveld J, Medina P, Mendes A, Monaco L. 1969.** Coffee. In: Ferwerda Fand Wid F, ed. *Outlines of perennial crop breeding in the tropics*. Wageningen: Veenman and Zonen, 189-241.
- Carvalho A, Medina Filho HP, Fazuoli LC, Guerreiro Filho O, Lima MMA. 1991.** Aspectos genéticos do cafeeiro. *Rev. Bras. Genet.* **14**: 135-183
- Causse M, Rocher JP, Henry AM, Charcosset A, Prioul JL, Vienne (de) D. 1995.** Genetic dissection of the relationship between carbon metabolism and early growth in maize, with emphasis on key-enzyme loci. **1**: 259-272
- Causse M, Santoni S, Damerval C, Maurice A, Charcosset A, Deatrick J, Vienne (de) D. 1996.** A composite map of expressed sequence in maize. *Genome* **39**: 418-432
- Causse M, Saliba-Colombani V, Lesschaeve I, Buret M. 2001.** Genetic analysis of organoleptic quality in fresh market tomato. 2. Mapping QTLs for sensory attributes. *Theor Appl Genet* **102**: 273-283
- Chakravarthy S, Tuori RP, D'Ascenzo MD, Fobert PR, Despres C, Martin GB. 2003.** The tomato transcription factor *Pti4* regulates defense-related gene expression via GCC box and non-GCC box cis elements. *Plant Cell* **15**: 3033-3050
- Chan SY, Chan AK, Cheung BP, Liang Y, Leung MP. 2003.** Identification of genes expressed during myocardial development. *Chin Med J (Engl)* **116**: 1329-1332
- Chandler PM. 1988.** Hormonal regulation of gene expression in the "slender" mutant of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Planta* **175**: 115-120
- Chandler VL, Stam M. 2004.** Chromatin conversations: mechanisms and implications of paramutation. *Nat Rev Genet* **5**: 532-544
- Chandler VL, Walbot V. 1986.** DNA modification of a maize transposable element correlates with loss of activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**: 1767-1771
- Charrier A. 1972.** L'intercompatibilité des clones de caféiers cultivés sur la Côte Est malgache. *Café Cacao Thé* **16**: 111-122
- Charrier A, Berthaud J. 1975.** Variation de la teneur en caféine dans le genre *Coffea*. *Café Cacao Thé* **19**: 251-264.
- Charrier A. 1976.** *La structure génétique des caféiers spontanés de la région malgache (Mascarocoffea). Leurs relations avec les caféiers d'origine africaine (Eucoffea)*. Université Paris-Sud, Paris. 223 pp.

- Chen W, Provart NJ, Glazebrook J, Katagiri F, Chang HS, Eulgem T, Mauch F, Luan S, Zou G, Whitham SA, Budworth PR, Tao Y, Xie Z, Chen X, Lam S, Kreps JA, Harper JF, Si-Ammour A, Mauch-Mani B, Heinlein M, Kobayashi K, Hohn T, Dangl JL, Wang X, Zhu T. 2002.** Expression profile matrix of Arabidopsis transcription factor genes suggests their putative functions in response to environmental stresses. *Plant Cell* **14**: 559-574
- Chetelat RT, Klann JW, DeVerna SY, Bennet AB. 1993.** Inheritance and genetic mapping of fruit sucrose accumulation in *Lycopersicon chmielewskii*. *Plant Journal* **4**: 643-650
- Chevalier A. 1947.** Les caféiers du globe: III. Systématique des caféiers et faux-caféiers maladies et insectes nuisibles. In: Lechevalier P, ed. *Encyclopedie Biologique*. Paris.
- Chomet PS, Wessler S, Dellaporta SL. 1987.** Inactivation of the maize transposable element Activator (Ac) is associated with its DNA modification. *Embo J* **6**: 295-302
- Chuang CF, Meyerowitz EM. 2000.** Specific and heritable genetic interference by double-stranded RNA in Arabidopsis thaliana. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 4985-4990
- Clifford MN. 1985.** Chemical and physical aspects of green coffee and coffee products. In: Clifford MN and Wilson KC, eds. *Coffee: Botany, Biochemistry and Production of Beans and Beverage*. Westport, CN: AVC Publishing Company, Inc.
- Coen ES, Carpenter R, Martin C. 1986.** Transposable elements generate novel spatial patterns of gene expression in *Antirrhinum majus*. *Cell* **47**: 285-296
- Coen ES, Carpenter R. 1988.** A semi-dominant allele, niv-525, acts in trans to inhibit expression of its wild-type homologue in *Antirrhinum majus*. *Embo J* **7**: 877-883
- Coen ES, Meyerowitz EM. 1991.** The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. *Nature* **353**: 31 - 37
- Cooper DN, Krawczak M, Antonorakis SE. 1995.** The nature and mechanisms of human gene mutation. In: C. Scriver AL, Beaudet, W. S. Sly, and D. Valle, ed. *Metabolic and molecular bases of inherited disease*. New-York: McGraw-Hill, pp. 259-261.
- Coulibaly I, Revol B, Noirot M, Poncet V, Lorieux M, Carasco-Lacombe C, Minier J, Dufour M, Hamon P. 2003.** AFLP and SSR polymorphism in a *Coffea* interspecific backcross progeny ((*C. heterocalyx* x *C. canephora*) x *C. canephora*). *Theor. Appl. Genet.* **107** :1148-1155.
- Costes R. 1989.** *Caféiers et cafés*. Paris. 376 pp.
- Craig NL. 1997.** Target site selection in transposition. *Annual Review of Biochemistry* **66**: 437-474
- Cramer PJS. 1957.** *A review of literature of coffee research in Indonesia*. Turrialba (Costa Rica): Interamerican Institute of Agricultural Sciences. 262 pp.
- Cros J. 1994.** *Implications phylogénétiques des variations de l'ADN chloroplastique chez les caféiers (genres Coffea L. et Psilanthus Hook. F.)*. Université Montpellier II, Montpellier, France
- Cros J, Combes MC, Chabrilange N, Duperray C, Monnot des Angles A, Hamon S. 1995.** Nuclear DNA content in the subgenus *Coffea* (*Rubiaceae*): inter- and intra-specific variation in African species. *Canadian Journal of Botany* **73**: 14-20
- Cros JM, Combes MC, Trouslot P, Anthony F, Hamon S, Charrier A, Lashermes P. 1998.** Phylogenetic analysis of chloroplast DNA variation in *Coffea* L. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **9**: 109-117.
- Crouzillat D, Rigoreau M, Bellanger L, Priyono P, Mawardi S, Syahrudi, McCarthy J, Tanksley S, Zaenudin I, Pétiard V. 2004.** A Robusta consensus map using RFLP and microsatellite markers for the detection of QTL. In: 20th International Scientific Colloquium on Coffee. Bangalore, pp.546-553.
- Cubas P, Vincent C, Coen E. 1999.** An epigenetic mutation responsible for natural variation in floral symmetry. *Nature* **401**: 157-161
- Cunningham ME, Lyndon RF. 1986.** The Relationship Between the Distribution of Periclinal Cell Divisions in the Shoot Apex and Leaf Initiation. *Annals of Botany* **57**: 737-746
- Cutter EG. 1965.** Recent experimental studies of the shoot apex and shoot morphogenesis. *Bot. Rev.* **31**: 7-113

D

- D'Amato F. 1977.** *Nuclear cytology in relation to development*. Cambridge: Cambridge University Press
- Damerval C, Le Guilloux M. 1998.** Characterization of novel proteins affected by the o2 mutation and expressed during maize endosperm development. *Mol Gen Genet* **257**: 354-361
- Darvasi A, Weinreb A, Minke V, Weller JI, Soller M. 1993.** Detecting marker-QTL linkage and estimating QTL gene effect and map location using a saturated genetic map. *Genetics* **134**: 943-951
- Darwin C. 1880.** *The power of movement in plants*. London: John Murray
- Davis, A.P., Bridson D.M., Rakotonasolo, F. 2005.** A reexamination of *Coffea* subgenus *Baracoffea* and comments on the morphology and classification of *Coffea* and *Psilanthus* (Rubiaceae-Coffeae). In R. C. Keating, V. C. Hollowell, and T. Croat [eds.], *Festschrift for William G. D'Arcy: The Legacy of a Taxonomist* (Monograph in Systematic Botany 104): 398-420. MBG Press, Missouri.
- Davis GL, McMullen MD, Baysdorfer C, Musket T, Grant D, Staebell M, Xu G, Polacco M, Koster L, Melia-Hancock S, Houchins K, Chao S, Coe EH, Jr. 1999.** A maize map standard with sequenced core markers, grass genome reference points and 932 expressed sequence tagged sites (ESTs) in a 1736-locus map. *Genetics* **152**: 1137-1172
- Daykin A, Scott IM, Francis D, Causton DR. 1997.** Effects of gibberellin on the cellular dynamics of dwarf pea internode development. *Planta* **203**: 526-535
- De Schepper S, Leus L, Mertens M, Debergh P, Van Bockstaele E, De Loose M. 2001.** Somatic polyploidy and its consequences for flower coloration and flower morphology in azalea. *Plant cell reports* **20**: 583-590
- De Vienne D, Leonardi A, Damerval C. 1988.** Genetic aspects of variation of protein amounts in maize and pea. *Electrophoresis* **9**: 742-750
- 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* **76**: 166-177
- Decazy F, Avelino J, Gyuyot B, Perriot JI, Pineda C, Cilas C. 2003.** Quality of different Honduran coffees in relation to several environments. *J. Food Sci.* **68**: 2356-2361
- Della Vedova CB, Cone KC. 2004.** Paramutation: the chromatin connection. *Plant Cell* **16**: 1358-1364
- Deng C, Davis TM. 1999.** Linkage relationship among anthocyanin biosynthesis genes and the c gene for yellow fruit color in *Fragaria vesca* (diploid strawberry). In: Heller SR, ed. *International conference on the status of plant and animal genome research VII Abstracts*. San Diego.
- Denver DR, Morris K, Lynch M, Thomas WK. 2004.** High mutation rate and predominance of insertions in the *Caenorhabditis elegans* nuclear genome. *Nature* **430**: 679-682
- Dermen H. 1948.** Chimera apple sports. *Journal of Heredity* **39**: 235-242
- Dermen H. 1951.** Ontogeny of Tissues in Stem and Leaf of cytochimeral Apples. *American Journal of Botany* **38**: 753-760
- Dermen H. 1953.** Periclinal Cytochimeras and Origin of Tissues in Stem and Leaf of Peach. *American Journal of Botany* **40**: 154-168
- Dermen H. 1960.** Nature of plant sports. *Am Horticultural Mag* **39**: 123-174
- D'Hont, A., Paget-Goy A., Escoute J, Carreel F. 2000.** The interspecific genome structure of cultivated banana, *Musa* spp. revealed by genomic DNA in situ hybridization. *Theoretical and Applied Genetics* **100** : 177-183
- D'Hont A., Grivet L, Feldmann P, Glaszmann JC, Rao S, Berding N. 2000.** Characterisation of the double genome structure of modern sugarcane cultivars (*Saccharum* spp.) by molecular cytogenetics. *Molecular and General Genetics* **250** : 405-413
- Diatchenko L, Lau YF, Campbell AP, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, Lukyanov S, Lukyanov K, 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 U S A* **93**: 6025-6030

- Dingkuhn M, Luquet D, Quilot B, Reffye (de) P. 2005.** Environmental and genetic control of morphogenesis in crops: towards models simulating phenotypic plasticity. *Australian Journal of Agricultural Research* **56**: 1289–1302
- Dingkuhn M, Luquet D, Kim HK, Tambour L, Clement-Vidal A. 2006.** EcoMeristem, a model of morphogenesis and competition among sinks in rice. 2. Simulating genotype responses to phosphorus deficiency. *Functional Plant Biology* **33**: 325–337
- Doebley J, Stec A. 1993.** Inheritance of the morphological differences between maize and teosinte: comparison of results for two F2 populations. *Genetics* **134**: 559-570
- Doebley J, Stec A, Gustus C. 1995.** Teosinte branched1 and the origin of maize: evidence for epistasis and the evolution of dominance. *Genetics* **141**: 333-346
- Draghici S, Kuklin A, Hoff B, Shams S. 2001.** Experimental design, analysis of variance and slide quality assessment in gene expression arrays. *Curr Opin Drug Discov Devel* **4**: 332-337
- Dublin P, Parvais JP. 1976.** L'haploïdie spontanée liée à la polyembryonie chez *Coffea arabica* L. *Café, Cacao, Thé* **20** (2) : 83-90
- Duckham SC, Linforth RST, Taylor IB. 1991.** Abscisic acid deficient mutants at the aba locus of *Arabidopsis thaliana* are impaired in the epoxydation of zeaxanthin. *Plant, Cell and Environment* **14**: 631-636
- Durrant WE, Rowland O, Piedras P, Hammond-Kosack KE, Jones JD. 2000.** cDNA-AFLP reveals a striking overlap in race-specific resistance and wound response gene expression profiles. *Plant Cell* **12**: 963-977

E

- Ecker JR. 1995.** The ethylene signal transduction pathway in plants. *Science* **268**: 667-675
- Elder JF, Turner BJ. 1995.** Concerted evolution of repetitive DNA sequences in eukaryotes. *Quarterly Review of Biology* **70**: 297-320
- Elliott KJ, Butler WO, Dickinson CD, Konno Y, Vedvick TS, Fitzmaurice L, Mirkov TE. 1993.** Isolation and characterization of fruit vacuolar invertase genes from two tomato species and temporal differences in mRNA levels during fruit ripening. *Plant Mol Biol* **21**: 515-524
- Eshed Y, Zamir D. 1996.** Less-than-additive epistatic interactions of quantitative trait loci in tomato. *Genetics* **143**: 1807-1817
- Ezan E. 2002.** Rapid Commun. *Mass Spectrom.* **16**: 1991-1996

F

- Faure JD, Vittorioso P, Santoni V, Fraissier V, Prinsen E, Barlier I, Van Onckelen H, Caboche M, Bellini C. 1998.** The pasticchino mutants of *Arabidopsis thaliana* are affected in development, cell proliferation and response to cytokinin. *Development* **125**: 919-928
- Fedoroff N, Masson P, Banks JA. 1989.** Mutations, epimutations, and the developmental programming of the maize Suppressor-mutator transposable element. *Bioessays* **10**: 139-144
- Feldman M. 1993.** Cytogenetic activity and mode of action of the pairing homoeologous (*Ph1*) gene of wheat. *Crop Science* **33**: 894-897
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. 1998.** Potent and specific genetics interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**: 806-811
- Firn RD. 1986.** Growth substance sensitivity: the need for clearer ideas, precise terms and purposeful experiments. *Physiologia plantarum* **67**: 267-272
- Fisher J, French J. 1976.** The Occurrence of Intercalary and Uninterrupted Meristems in the Internodes of Tropical Monocotyledons. *American Journal of Botany* **63**
- Fizames C, Munos S, Cazettes C, Nacry P, Boucherez J, Gaymard F, Piquemal D, Delorme V, Commes T, Doumas P, Cooke R, Marti J, Sentenac H, Gojon A. 2004.** The *Arabidopsis* root transcriptome by serial analysis of gene expression. Gene identification using the genome sequence. *Plant Physiol* **134**: 67-80

- Fodor SP, Rava RP, Huang XC, Pease AC, Holmes CP, Adams CL. 1993.** Multiplexed biochemical assays with biological chips. *Nature* **364**: 555-556
- Folstar P. 1985.** Lipids. In: Clarke RJ and Macrae R, eds. *Coffee: Chemistry, Vol II*. London: Elsevier applied Science.
- Foucher F, Morin J, Courtiade J, Cadioux S, Ellis N, Banfield MJ, Rameau C. 2003.** DETERMINATE and LATE FLOWERING are two TERMINAL FLOWER1/CENTRORADIALIS homologs that control two distinct phases of flowering initiation and development in pea. *Plant Cell* **15**: 2742-2754
- Franquin P. 1974.** Développement de la structure fondamentale ou développement morphogénétique de la plante. *Cahiers de l'ORSTOM Série biologique* **23**: 23-30
- Franquin P. 1985.** Compétition, développement morphogène du cotonnier et production de la plante. *Acta Oecologia* **6**: 153-167
- Frary A, Nesbitt TC, Grandillo S, Knaap E, Cong B, Liu J, Meller J, Elber R, Alpert KB, Tanksley SD. 2000.** fw2.2: a quantitative trait locus key to the evolution of tomato fruit size. *Science* **289**: 85-88
- Frary A, Nesbitt TC, Grandillo S, Knaap E, Cong B, Liu J, Meller J, Elber R, Alpert KB, Tanksley SD. 2000b.** fw2.2: a quantitative trait locus key to the evolution of tomato fruit size. *Science* **289**: 85-88
- Freimer NB, Slatkin M. 1996.** Microsatellites: evolution and mutational processes. *Ciba Foundation Symposium* **197**: 51-72
- Fridman E, Pleban T, Zamir D. 2000.** A recombination hotspot delimits a wild-species quantitative trait locus for tomato sugar content to 484 bp within an invertase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 4718-4723
- Fujioka S, Yamane H, Spray CR, Katsumi M, Phinney BO, Gaskin P, Macmillan J, Takahashi N. 1988.** The dominant non-gibberellin-responding dwarf mutant (D8) of maize accumulates native gibberellins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**: 9031-9035
- Fuks F, Hurd PJ, Wolf D, Nan X, Bird AP, Kouzarides T. 2003.** The methyl-CpG-binding protein MeCP2 links DNA methylation to histone methylation. *J Biol Chem* **278**: 4035-4040
- Fukui K, Ohmido N, Khush GS. 1994.** Variability in rDNA loci in the genus *Oryza* detected through fluorescence in situ hybridization. *Theoretical Applied Genetics* **87**: 893-899

G

- Gai X, Lal S, Xing L, Brendel V, Walbot V. 2000.** Gene discovery using the maize genome database ZmDB. *Nucleic Acids Res* **28**: 94-96
- Garrison R. 1973.** The Growth and Development of Internodes in *Helianthus*. *Botanical Gazette* **134**: 246-255
- Gill GP, Brown GR, Neale DB. 2003.** A sequence mutation in the cinnamyl alcohol dehydrogenase gene associated with altered lignification in loblolly pine. *Plant Biotechnology Journal* **1**: 253-258
- Goda H, Sawa S, Asami T, Fujioka S, Shimada Y, Yoshida S. 2004.** Comprehensive comparison of auxin-regulated and brassinosteroid-regulated genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **134**: 1-19
- Gottlieb LD, Vienne (de) D. 1988.** Assessment of pleiotropic effects of a gene substitution in pea by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Genetics* **119**: 705-710
- Grandbastien MA, Spielmann A, Caboche M. 1989.** Tnt1, a mobile retroviral-like transposable element of tobacco isolated by plant cell genetics. *Nature* **337**: 376-380
- Granier C, Aguirrezabal L, Chenu K, Cookson SJ, Dautat M, Hamard P, Thioux JJ, Rolland G, Bouchier-Combaud S, Lebaudy A, Muller B, Simonneau T, Tardieu F. 2006.** PHENOPSIS, an automated platform for reproducible phenotyping of plant responses to soil water deficit in *Arabidopsis thaliana* permitted the identification of an accession with low sensitivity to soil water deficit. *New Phytologist* **169**: 623-635
- Green PB. 1985.** Surface of the shoot apex: a reinforcement-field theory for phyllotaxis. *J Cell Sci Suppl* **2**: 181-201
- Griffin TJ, Gygi SP, Ideker T, Rist B, Eng J, Hood L, Aebersold R. 2002.** Complementary profiling of gene expression at the transcriptome and proteome levels in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Proteomics* **1**: 323-333

- Griffor MC, Vodkin LO, Singh RJ, Hymowitz T. 1991.** Fluorescent in situ hybridization to soybean metaphase chromosomes. *Plant Mol Biol* **17**: 101-109
- Grove MD, Spencer GF, Rohwedder WK, Mandava N, Worley JF, Warthen JDJ, Steffens GL, Flippen-Anderson JL, Cook JCJ. 1979.** Brassinolide, a plant growth-promoting steroid isolated from *Brassica napus* pollen. *Nature* **281**: 216 - 217
- Guzman P, Ecker JR. 1990.** Exploiting the triple response of *Arabidopsis* to identify ethylene-related mutants. *Plant Cell* **2**: 513-523
- Gygi SP, Rochon Y, Franza BR, Aebersold R. 1999.** Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol Cell Biol* **19**: 1720-1730

H

- Ha S, Moore PH, Heinz D, Kato S, Ohmido N, Fukui K. 1999.** Quantitative chromosome map of the polyploid *Saccharum spontaneum* by multicolor fluorescence in situ hybridization and imaging methods. *Plant molecular biology*. **39** : 1165-1173
- Haarer A. 1956.** *Modern coffee production*. London: Leonard Hill. 467p pp.
- Hallé F, Oldeman R. 1970.** *Essai sur l'architecture et la dynamique de croissance des arbres tropicaux*. Paris: Masson et Cie
- Harberd NP, Freeling M. 1989.** Genetics of Dominant Gibberellin-Insensitive Dwarfism in Maize. *Genetics* **121**: 827-838
- Harting M. 1845.** Recherches micrométriques sur le développement des parties élémentaires de la tige annuelle des plantes dicotylédonées. *Ann Sci Nat Bot, Sér. 3*. **4**: 210-279
- Harushima Y, Yano M, Shomura A, Sato M, Shimano T, Kuboki Y, Yamamoto T, Lin SY, Antonio BA, Parco A, Kajiya H, Huang N, Yamamoto K, Nagamura Y, Kurata N, Khush GS, Sasaki T. 1998.** A high-density rice genetic linkage map with 2275 markers using a single F2 population. *Genetics* **148**: 479-494
- Hedden P, Phillips AL. 2000.** Gibberellin metabolism: new insights revealed by the genes. *Trends Plant Sci* **5**: 523-530
- Henderson WR, Scott GH, Wehner TC. 1998.** Interaction of Flesh Color Genes in Watermelon. *Journal of Heredity* **89**: 50-53
- Henikoff S, Furuyama T, Ahmad K. 2004.** Histone variants, nucleosome assembly and epigenetic inheritance. *Trends Genet* **20**: 320-326
- Herbik A, Giritch A, Horstmann C, Becker R, Balzer HJ, Baumlein H, Stephan UW. 1996.** Iron and copper nutrition-dependent changes in protein expression in a tomato wild type and the nicotianamine-free mutant chloronerva. *Plant Physiol* **111**: 533-540
- Hess WR, Schendel R, Rüdiger W, Fieder B, Börner T. 2005.** Components of chlorophyll biosynthesis in a barley albina mutant unable to synthesize beta-aminolevulinic acid by utilizing the transfer RNA for glutamic acid. *Planta* **188**: 19-27
- Hinderhofer K, Zentgraf U. 2001.** Identification of a transcription factor specifically expressed at the onset of leaf senescence. *Planta* **213**: 469-473
- Hocquigny S, Pelsy F, Dumas V, Kindt S, Heloir MC, Merdinoglu D. 2004.** Diversification within grapevine cultivars goes through chimeric states. *Genome* **47**: 579-589
- Holliday R, Pugh JE. 1975.** DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science* **187**: 226-232
- Holliday R. 1987.** The inheritance of epigenetic defects. *Science* **238**: 163-170
- Holliday R, Ho T. 2002.** DNA methylation and epigenetic inheritance. *Methods* **27**: 179-183
- Howell SH. 1998.** *Molecular Genetics of Plant Development*. Cambridge: Cambridge university press. 384p pp.
- Hsiao T. 1973.** Plant Responses to Water Stress. *Annual Review of Plant Physiology* **27**: 519-570
- Hua J, Meyerowitz EM. 1998.** Ethylene responses are negatively regulated by a receptor gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Cell* **94**: 261-271

I

- Iba K, Gibson S, Nishiuchi T, Fuse T, Nishimura M, Arondel V, Hugly S, Somerville C. 1993.** A gene encoding a chloroplast omega-3 fatty acid desaturase complements alterations in fatty acid desaturation and chloroplast copy number of the *fad7* mutant of *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* **268**: 24099-24105
- Ingram TJ, Reid JB. 1987.** Internode Length in Pisum: Gene na May Block Gibberellin Synthesis between ent-7alpha-Hydroxykaurenoic Acid and Gibberellin A(12)-Aldehyde. *Plant Physiol* **83**: 1048-1053
- Ingram TJ, Reid JB, MacMillan J. 1986.** The quantitative relationship between gibberellin A1 and internode growth in *Pisum sativum* L. *Planta* **168**: 414-420
- Islam-Faridi MN, Childs KL, Klein PE, Hodnett G, Menz MA, Klein RR, Rooney WL, Mullet JE, Stelly DM, Price HJ. 2002.** A Molecular Cytogenetic Map of Sorghum Chromosome 1: Fluorescence *in Situ* Hybridization Analysis With Mapped Bacterial Artificial Chromosomes. *Genetics*, **161** : 345-353
- Issa JP. 2000.** CpG-island methylation in aging and cancer. *Curr Top Microbiol Immunol* **249**: 101-118
- Itoh JI, Hasegawa A, Kitano H, Nagato Y. 1998.** A recessive heterochronic mutation, *plastochron1*, shortens the *plastochron* and elongates the vegetative phase in rice. *Plant Cell* **10**: 1511-1522
- Izawa T, Oikawa T, Sugiyama N, Tanisaka T, Yano M, Shimamoto K. 2002.** Phytochrome mediates the external light signal to repress FT orthologs in photoperiodic flowering of rice. *Genes Dev* **16**: 2006-2020

J

- Jacobsen E, De Jong JH, Kamstra SA, Van den Berg PMMM, Ramanna MS. 1995.** Genomic *in situ* hybridization (GISH) and RFLP analysis for the identification of alien chromosomes in the backcross progeny of potato (+) tomato fusion hybrids. *Heredity*. **74**: 250-257.
- Jacobsen SE, Meyerowitz EM. 1997.** Hypermethylated SUPERMAN epigenetic alleles in *Arabidopsis*. *Science* **277**: 1100-1103
- Jacobsen SE, Sakai H, Finnegan EJ, Cao X, Meyerowitz EM. 2000.** Ectopic hypermethylation of flower-specific genes in *Arabidopsis*. *Curr Biol* **10**: 179-186
- Jaenisch R, Bird A. 2003.** Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet* **33 Suppl**: 245-254
- Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL. 1985.** Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature* **314**: 67-73
- Ji W, Wright MB, Cai L, Flament A, Lindpaintner K. 2002.** Efficacy of SSH PCR in isolating differentially expressed genes. *BMC Genomics* **3**: 12
- Johnson L, Cao X, Jacobsen S. 2002.** Interplay between two epigenetic marks. DNA methylation and histone H3 lysine 9 methylation. *Curr Biol* **12**: 1360-1367
- Jones WN. 1934.** *Plant chimeras and graft hybrids*. London
- Jorgensen CA, Crane MB. 1927.** Formation and morphology of *Solanum* chimaeras. *Jour Genet* **18**: 247-272

K

- Kakutani T, Munakata K, Richards EJ, Hirochika H. 1999.** Meiotically and mitotically stable inheritance of DNA hypomethylation induced by *ddm1* mutation of *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **151**: 831-838
- Kakutani T. 2002.** Epi-alleles in plants: inheritance of epigenetic information over generations. *Plant Cell Physiol* **43**: 1106-1111
- Kamo M, Kawakami T, Miyatake N, Tsugita A. 1995.** Separation and characterization of *Arabidopsis thaliana* proteins by two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis* **16**: 423-430
- Kashkush K, Feldman M, Levy AA. 2003.** Transcriptional activation of retrotransposons alters the expression of adjacent genes in wheat. *Nat Genet* **33**: 102-106
- Kazazian HH, Jr. 2004.** Mobile elements: drivers of genome evolution. *Science* **303**: 1626-1632

- Kende H, Zeevaart AD. 1997.** The Five "Classical" Plant Hormones. *The Plant Cell* **9**: 1197-1210
- Kimura M. 1968.** Evolutionary rate at the molecular level. *Nature* **217**: 624-626
- Kimura M. 1983.** *Neutral theory of molecular evolution*. Cambridge: Cambridge University Press
- Kinzer SM, Schwager SJ, Mutschle MA. 1990.** Mapping of ripening-related or -specific cDNA clones of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Theor Appl Genet* **79**: 489-496
- Klee H, Estelle M. 1991.** Molecular genetic approaches to plant hormone biology. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular* **42**: 529-551
- Konishi T, Linde-Laursen I. 1987.** Spontaneous chromosomal rearrangements in cultivated and wild barleys. *Theoretical and Applied Genetics* **75**: 237 - 243
- Koornneef M, Dellaert LW, van der Veen JH. 1982.** EMS- and radiation-induced mutation frequencies at individual loci in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Mutat Res* **93**: 109-123
- Kornberg A, Baker TA. 1992.** *DNA Replication, 2nd Ed.* New York: W. H. Freeman and Company
- Kroll TC, Wolfi S. 2002.** Ranking: a closer look on globalisation methods for normalisation of gene expression arrays. *Nucleic Acids Res* **30**: 45-50
- Krug CA, Mendes J, Carvalho A. 1939.** *Taxonomia de Coffea arabica L.* Campinas, Brazil: Instituto Agronomico de estado de Sao Paulo
- Krug CA, Mendes A. 1940.** Cytological observations in *Coffea*. IV. *Journ. Gent.* **39**: 189-203
- Krug CA, Mendes A. 1943.** Conhecimentos gerais sôbre a genética e citologia do gênero *Coffea*. *Revista Agric.(Piracicaba)* **18**: 399-408
- Krug CA. 1949.** Mutações em *Coffea arabica L.* *Bragantia* **9**: 1-10
- Krug CA, Carvalho A. 1951.** The genetics of coffee. *Adv Genet* **4**: 127-158
- Krug CA, Carvalho A, Antunes Filho H. 1954.** Genetica de *Coffea*. XXI. Hereditariedade dos caracteriscos de *Coffea arabica L.* var. *laurina* (Smeathman) DC. *Bragantia* **13**: 247-255
- Kurosawa E. 1926.** Experimental studies on the nature of the substance secreted by the 'bakanae' fungus. *Nat Hist Soc Formosa*
- Ky CL, Barre P, Lorieux M, Trouslot P, Akaffou S, Louarn J, Charrier A, Hamon S, Noirot M. 2000.** Interspecific genetic linkage map, segregation distortion and genetic conversion in coffee (*Coffea* sp.). *Theoretical and Applied Genetics* **101**: 669-676
- Ky CL, Louarn J, Dussert S, Guyot B, Hamon S, Noirot M. 2001.** Caffeine, trigonelline, chlorogenic acids and sucrose diversity in wild *Coffea arabica L.* and *C. canephora P.* accessions. *Food Chemistry* **75**: 223-230.

L

- Lanahan MB, Ho T-HD. 1988.** Slender barley: A constitutive gibberellin-response mutant. *Planta* **175**: 107-114
- Lance A. 1957.** Recherches cytologiques sur l'évolution de quelques méristèmes apicaux et sur ses variations provoquées par des traitements photopériodiques. *Ann Sci Nat Bot, 11ème série* **18**: 91-421
- Lander ES, Botstein D. 1989.** Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* **121**: 185-199
- Lander ES, Schork NJ. 1994.** Genetic dissection of complex traits. *Science* **265**: 2037-2048
- Lashermes P, Cros PJ, Marmey P, Charrier A. 1993.** Use of random amplified DNA markers to analyse genetic variability and relationships of *Coffea* species. *Genetic Resources and Crop Evolution* **40**: 91-99.
- Lashermes P, Couturon E, Moreau M, Paillard M, Louarn J. 1996.** Inheritance and genetic mapping of self-incompatibility in *Coffea canephora* Pierre. *Theoretical and Applied Genetics* **93**: 458-462
- Lashermes P, Combes MC, Trouslot P, Charrier A. 1997.** Phylogenetic relationships of coffee-tree species (*Coffea L.*) as inferred from ITS sequences of nuclear ribosomal DNA. *Theoretical and Applied Genetics* **94**: 947-955

- Lashermes P, Combes MC, Robert J, Trouslot P, D'Hont A, Anthony F, Charrier A. 1999.** Molecular characterisation and origin of the *Coffea arabica* L. genome. *Molecular and General Genetics* **261**: 259-266
- Lashermes P, Paczek V, Trouslot P, Combes MC, Couturon E, Charrier A. 2000a.** Single-locus inheritance in the allotetraploid *Coffea arabica* L. and interspecific hybrid *C. arabica* x *C. canephora*. *Journal of Heredity*: 81-85
- Lashermes P, Andrzejewski S, Bertrand B, Combes MC, Dussert S, Graziosi G, Trouslot P, Anthony F. 2000b.** Molecular analysis of introgressive breeding in coffee (*Coffea arabica* L.). *Theoretical and Applied Genetics* **100**: 139-146
- Lashermes P, Combes MC, Prakash NS, Trouslot P, Lorieux M, Charrier A. 2001.** Genetic linkage map of *Coffea canephora*: effect of segregation distortion and analysis of recombination rate in male and female meioses. *Genome* **44**: 589-596.
- Laufs P, Grandjean O, Jonak C, Kieu K, Traas J. 1998a.** Cellular parameters of the shoot apical meristem in Arabidopsis. *Plant Cell* **10**: 1375-1390
- Laufs P, Jonak C, Traas J. 1998b.** Cells and domains: Two views of the shoot meristem in Arabidopsis. *Plant Physiology and Biochemistry* **36**: 33-45
- Laurie DA, Bennett MD. 1985.** Nuclear DNA content in the genera *Zea* and *Sorghum*.
- Lefebvre V, Kuntz M, Camara B, Palloix A. 1998.** The capsanthin-capsorubin synthase gene: a candidate gene for the y locus controlling the red fruit colour in pepper. *Plant Mol Biol* **36**: 785-789
- Lehnertz B, Ueda Y, Derijck AA, Braunschweig U, Perez-Burgos L, Kubicek S, Chen T, Li E, Jenuwein T, Peters AH. 2003.** Suv39h-mediated histone H3 lysine 9 methylation directs DNA methylation to major satellite repeats at pericentric heterochromatin. *Curr Biol* **13**: 1192-1200
- Leitch IJ, Heslop Harrison JS. 1992.** Physical mapping of the 18S-5.8S-26S rRNA genes in Barley by *in situ* hybridization. *Genome* **35**: 1013-1020
- Lejeune J. 1958.** *Rapport au Gouvernement imperial d'Ethiopie sur la production caféière*. Rome, Italie
- Leroy JF. 1980.** Evolution et taxogénèse chez les caféiers. Hypothèse sur leur origine., ed. *Comptes rendus de l'Académie des Sciences*. Paris, 593-596.
- Li CH, Zhu YQ, Meng YL, Wang JW, Xu KX, Zhang TZ, Chen XY. 2002.** Isolation of genes preferentially expressed in cotton fibers by cDNA filter arrays and RT-PCR. *Plant Science* **163**: 1113-1120
- Li WH, Gojobori T, Nei M. 1981.** Pseudogenes as a paradigm of neutral evolution. *Nature* **292**: 237 - 239
- Liang P, Pardee AB. 1992.** Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* **257**: 967-971
- Liao D. 1999.** Concerted evolution: molecular mechanism and biological implications. *Am J Hum Genet* **64**: 24-30
- Liu CJ, Atkinson MD, Chinoy CN, Devos KM, Gale MD. 1992.** onhomologous translocations between group-4, group-5 and group-7 chromosomes within wheat and rye. *Theor Appl Genet* **83**: 305-312
- Lockhart DJ, Winzeler EA. 2000.** Genomics, gene expression and DNA arrays. *Nature* **405**: 827-836
- Louarn J. 1992.** *La fertilité des hybrides interspécifiques et les relations génomiques entre caféiers diploïdes d'origine africaine (Genre Coffea L. sous-genre Coffea)*. Montpellier II, Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier, France. 135 pp.
- Luquet D, Zhang B, Dingkuhn M, Dexet A, Clement-Vidal A. 2005.** Phenotypic plasticity of rice seedlings : Case of phosphorus deficiency. *Plant production science* **8**: 145-151
- Luquet D, Dingkuhn M, Kim HK, Tambour L, Clement-Vidal A. 2006.** EcoMeristem, a model of morphogenesis and competition among sinks in rice. 1. Concept, validation and sensitivity analysis. *Functional Plant Biology* **33**: 309-323
- Lyndon RF. 1987.** Synchronization of cell division during flower initiation in third-order buds of *Silene*. *Annals Of Botany* **59**: 67-72
- Lyndon RF, Cunninghame ME. 1986.** Control of shoot apical development via cell division. *Symp Soc Exp Biol* **40**: 233-255

M

- MacKay JJ, O'Malley DM, Presnell T, Booker FL, Campbell MM, Whetten RW, Sederoff RR. 1997.** Inheritance, gene expression, and lignin characterization in a mutant pine deficient in cinnamyl alcohol dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 8255-8260
- Maksymowych R, Maksymowych A. 1973.** Induction of Morphogenetic Changes and Acceleration of Leaf Initiation by Gibberellic Acid in *Xanthium pennsylvanicum*. *American Journal of Botany* **60**: 901-906
- Maksymowych R, Erickson R. 1977.** Phyllotactic Change Induced by Gibberellic Acid in *Xanthium* Shoot Apices. *American Journal of Botany* **64**: 33-44
- Maluszynska J, Heslop-Harrison JS. 1993.** Physical mapping of rDNA loci in Brassica species. *Genome* **36**: 774-781
- Manning K, Tor M, Poole M, Hong Y, Thompson AJ, King GJ, Giovannoni JJ, Seymour GB. 2006.** A naturally occurring epigenetic mutation in a gene encoding an SBP-box transcription factor inhibits tomato fruit ripening. *Nat Genet* **38**: 948-952
- Mantelin S. 2005.** *Effet stimulateur d'une souche PGPR de Phyllobacterium sur la croissance d'Arabidopsis thaliana : caractérisation de la réponse morphogénétique du système racinaire et impact sur la nutrition azotée.* Université Montpellier II, Sciences et techniques du Languedoc, Montpellier. 170 pp. pp.
- Martienssen R. 1998.** Transposons, DNA methylation and gene control. *Trends Genet* **14**: 263-264
- Martienssen R, Baron A. 1994.** Coordinate suppression of mutations caused by Robertson's mutator transposons in maize. *Genetics* **136**: 1157-1170
- Martienssen RA, Colot V. 2001.** DNA methylation and epigenetic inheritance in plants and filamentous fungi. *Science* **293**: 1070-1074
- Martoja R, Martoja-Pierson M. 1967.** *Initiation aux Techniques de l'Histologie Animale.* Paris: Masson et Cie
- Mazzafera P, Sivarolla MB, Alves de Lima MM, Medina Filho P. 1997.** Caffeine content of diploid coffee species. *Ciencia e Cultura* **49**: 216-218.
- May BP, Liu H, Vollbrecht E, Senior L, Rabinowicz PD, Roh D, Pan X, Stein L, Freeling M, Alexander D, Martienssen R. 2003.** Maize-targeted mutagenesis: A knockout resource for maize. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 11541-11546
- Mayer KF, Schoof H, Haecker A, Lenhard M, Jurgens G, Laux T. 1998.** Role of WUSCHEL in regulating stem cell fate in the Arabidopsis shoot meristem. *Cell* **95**: 805-815
- McCallum CM, Comai L, Greene EA, Henikoff S. 2000.** Targeting induced local lesions IN genomes (TILLING) for plant functional genomics. *Plant Physiol* **123**: 439-442
- McClintock B. 1931.** The Order of the Genes C, Sh and Wx in Zea Mays with Reference to a Cytologically Known Point in the Chromosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **17**: 485-491
- McClintock B. 1933.** The association of non-homologous parts of chromosomes in the mid-prophase of meiosis in Zea mays. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat* **19**: 191-237
- McClintock B. 1951.** Chromosome organization and genic expression. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **16**: 13-47
- McClintock B. 1984.** The significance of responses of the genome to challenge. *Science* **226**: 792-801
- Mc Clure BA, Guilfoyle TJ. 1989.** Tissue print hybridization. A simple technique for detecting organ- and tissue-specific gene expression. *Plant Mol Biol* **12**: 517-524
- McKhann HI, Camilleri C, Berard A, Bataillon T, David JL, Reboud X, Le Corre V, Caloustian C, Gut IG, Brunel D. 2004.** Nested core collections maximizing genetic diversity in Arabidopsis thaliana. *Plant J* **38**: 193-202
- Michelmore RW, Paran I, Kesseli RV. 1991.** Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 9828-9832
- Miyoshi K, Ahn BO, Kawakatsu T, Ito Y, Itoh J, Nagato Y, Kurata N. 2004.** PLASTOCHRON1, a timekeeper of leaf initiation in rice, encodes cytochrome P450. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 875-880

- Mizukami Y, Fischer RL. 2000.** Plant organ size control: AINTEGUMENTA regulates growth and cell numbers during organogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 942-947
- Moens P. 1962.** *Étude écologique du développement génératif et végétatif des bourgeons de Coffea canephora Pierre (L' initiation florale)*. Bruxelles: Institut National pour l' étude Agronomique du Congo (INEAC). 103 pp.
- Moll J. 1876.** *The inflence of cell division and cell elongation on growth (in Dutch)*. Utrecht: L.E Bosh en zoom
- Money T, Reader S, Qu LJ, Dunford RP, Moore G. 1996.** AFLP-based mRNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* **24**: 2616–2617
- Morgan TH, Bridges CB, Sturtevant AH. 1925.** The genetics of Drosophila. *Bibliogr Genetica* **2**: 1-262
- Mori M, Nomura T, Ooka H, Ishizaka M, Yokota T, Sugimoto K, Okabe K, Kajiwara H, Satoh K, Yamamoto K, Hirochika H, Kikuchi S. 2002.** Isolation and characterization of a rice dwarf mutant with a defect in brassinosteroid biosynthesis. *Plant Physiol* **130**: 1152-1161
- Muller HJ. 1940.** An analysis of the process of structural changes in chromosomes of drophilia. *Genetics* **10**: 1-66
- Mullis KB. 1994.** *The Polymerase Chain Reaction*. Boston: Birkhäuser. 458 pp.
- Murata M, Varga F, Schweigzer D. 1990.** Chromosome mapping of ribosomal RNA genes in *Arabidopsis thaliana*. *J. Genet.* **65**: 450-453
- Murata M, Heslop-Harrison JS, Motoyoshi F. 1997.** Physical mapping of the 5S ribosomal RNA genes in *Arabidopsis thaliana* by multi-color fluorescence in situ hybridization with cosmid clones. *Plant J* **12**: 31-37
- Murray DL, Kohorn BD. 1991.** Chloroplasts of *Arabidopsis thaliana* homozygous for the ch-1 locus lack chlorophyll b, lack stable LHCPII and have stacked thylakoids. *Plant Mol Biol* **16**: 71-79
- Mustilli AC, Fenzi F, Ciliento R, Alfano F, Bowler C. 1999.** Phenotype of the tomato high pigment-2 mutant is caused by a mutation in the tomato homolog of DEETIOLATED1. *Plant Cell* **11**: 145-157

N

- Naranjo T, Roca A, Goicoechea PG, Giraldez R. 1987.** Arm homoeology of wheat and rye chromosomes. *Genome* **29**: 873–882
- Neill SJ, Horgan R. 1985.** Abscisic Acid Production and Water Relations in Wilty Tomato Mutants Subjected to Water Deficiency. *Journal of experimental Botany* **36**: 1222-1231
- Neilson-Jones W. 1969.** *Plant Chimeras*. London: Methuen and Co. 123pp.
- N'diaye A. 2005.** Etude de la différenciation génétique de *Coffea liberica* Hiern. Cartographie génétique du croisement interspécifique entre *Coffea liberica* et *Coffea canephora*. Recherche de QTL. University of Montpellier, France, PhD thesis.
- Nishikawa J, Kiss C, Imai S, Takada K, Okita K, Klein G, Szekely L. 2003.** Upregulation of the truncated basic hair keratin 1(hHb1-DeltaN) in carcinoma cells by Epstein-Barr virus (EBV). *Int J Cancer* **107**: 597-602
- Noirot M, Poncet V, Barre P, Hamon P, Hamon S, Kochko de A. 2003.** Genome size variations in diploid African *Coffea* species. *Annals Of Botany* **92**: 709-714
- Nougarède A. 1967.** Experimental cytology of the shoot apical cells during vegetative growth and flowering. *International Review of cytology* **21**: 203-351

O

- O'Farrell PH. 1975.** High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* **250**: 4007-4021
- Ohkuma K, Lyon JL, Addicott FT, Smith OE. 1963.** Abscisin II, an Abscission-Accelerating Substance from Young Cotton Fruit. *Science* **142**: 1592 - 1593
- O'Neill DP, Ross JJ. 2002.** Auxin regulation of the gibberellin pathway in pea. *Plant Physiol* **130**: 1974-1982
- Orkiszewski JAJ, Maksymowych R, Maksymowych AB. 1979.** Regulatory role of indole-3-acetic acid and gibberellic acid in vegetative development of *Xanthium pennsylvanicum*. *American Journal of Botany* **66**: 532-537

Osakabe Y, Miyata S, Urao T, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. 2002. Overexpression of Arabidopsis response regulators, ARR4/ATRR1/IBC7 and ARR8/ATRR3, alters cytokinin responses differentially in the shoot and in callus formation. *Biochem Biophys Res Commun* **293**: 806-815

Owen FV. 1942. Male sterility in sugar beets produced by complementary effects of cytoplasmic and Mendelian inheritance. *American Journal of Botany* **29**: 692-701

P

Paal A. 1918. Uber phototropische reizleitung. *Jahr. Wiss. Bot.* **58**: 406-458

Padmore R, Cao L, Kleckner N. 1991. Temporal comparison of recombination and synaptonemal complex formation during meiosis in *S. cerevisiae*. *Cell* **66**: 1239-1256

Paillard M, Lashermes P, Pétiard V. 1996. Construction of a molecular linkage map in coffee. *Theor. Appl. Genet.* **93**: 41-47.

Pan Q, Liu YS, Budai-Hadrian O, Sela M, Carmel-Goren L, Zamir D, Fluhr R. 2000. Comparative genetics of nucleotide binding site-leucine rich repeat resistance gene homologues in the genomes of two dicotyledons: tomato and arabidopsis. *Genetics* **155**: 309-322

Patterson AH, Lander ES, Hewitt JD, Perterson S, Lincoln SE, Tanksley SD. 1988. Resolution of quantitative traits into Mandelian factors by using a complete linkage map of restriction fragment length polymorphisms. *Nature* **335**: 721-726

Patterson GI, Chandler VL. 1995. Paramutation in maize and related allelic interactions. *Curr Top Microbiol Immunol* **197**: 121-141

Pearl HM, Nagai C, Moore PH, Steiger DL, Osgood RV, Ming R. 2004. Construction of a genetic map for arabica coffee. *Theor Appl Genet* **108**: 829-835

Pease AC, Solas D, Sullivan EJ, Cronin MT, Holmes CP, Fodor SP. 1994. Light-generated oligonucleotide arrays for rapid DNA sequence analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 5022-5026

Peng J, Carol P, Richards DE, King KE, Cowling RJ, Murphy GP, Harberd NP. 1997. The Arabidopsis GAI gene defines a signalling pathway that negatively regulates gibberellin responses. *Genes Dev* **11**: 3194-3205

Perez-Amador MA, Lidder P, Johnson MA, Landgraf J, Wisman E, Green PJ. 2001. New molecular phenotypes in the dst mutants of Arabidopsis revealed by DNA microarray analysis. *Plant Cell* **13**: 2703-2717

Peschke VM, Phillips R, Gengenback BG. 1987. Discovery of transposable elements activity among progeny of tissue culture-derived plants. *Science* **238**: 804-807

Peters JL, Cnudde F, Gerats T. 2003. Forward genetics and map-based cloning approaches. *Trends Plant Sci.* **8**: 484-491

Petersen M, Brodersen P, Naested H, Andreasson E, Lindhart U, Johansen B, Nielsen HB, Lacy M, Austin MJ, Parker JE, Sharma SB, Klessig DF, Martienssen R, Mattsson O, Jensen AB, Mundy J. 2000. Arabidopsis map kinase 4 negatively regulates systemic acquired resistance. *Cell* **103**: 1111-1120

Pfeifer GP, Steigerwald SD, Hansen RS, Gartler SM, Riggs AD. 1990. Polymerase chain reaction-aided genomic sequencing of an X chromosome-linked CpG island: methylation patterns suggest clonal inheritance, CpG site autonomy, and an explanation of activity state stability. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 8252-8256

Phinney BO. 1956. Growth responses of single-gene dwarf mutants in maize to gibberellic acid. *Proc. nat. Acad. Sci. Wash* **42**: 185-189

Phinney BO. 1984. Gibberellin A 1, dwarfism and the control of shoot elongation in higher plants. In: Crozier Aand Hillman JR, ed. *The Biosynthesis and Metabolism of Plant Hormones*. Cambridge: Cambridge university press, pp. 17-41.

Plantefol L. 1948. *La théorie des hélices foliaires multiples*. Paris: Masson et Cie. 154 pp.

Potts WC, Reid JB, Murfet IC. 1985. Internode length in Pisum, gibberellins and the slender phenotype. *Physiologia plantarum* **63**: 357-364

Prioul J, Pelleschi S, Sene M, Theevenot C, Causse M, Vienne (de) D, Leonardi A. 1999. From QTLs for enzyme activity to candidate genes in maize. *Journal of experimental Botany* **50**: 1281-1288

Putterill J, Robson F, Lee K, Simon R, Coupland G. 1995. The CONSTANS gene of Arabidopsis promotes flowering and encodes a protein showing similarities to zinc finger transcription factors. *Cell* **80**: 847-857

Q

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 Res* **29**: 1616-1622

Queitsch C, Sangster TA, Lindquist S. 2002. Hsp90 as a capacitor of phenotypic variation. *Nature* **417**: 618-624

Raina S, Mukai Y, Yamamoto M. 1998. In situ hybridization identifies the diploid progenitor species of Coffea arabica (Rubiaceae). *Theoretical and Applied Genetics* **99**: 1204 - 1209

R

Ramirez H. 2001. Physiology of blooming of a low chilling requirement golden delicious apple mutant. *Acta Hort. (ISHS)* **565**: 87-90

Ramírez H, Benavides A, Rangel EA. 2004. Identification of gibberellins in seeds of a golden delicious apple mutant. *Acta Hort. (ISHS)* **653**: 201-206

Ramirez H, Mata-Beltran L. 1986. Flowering capacity of a golden delicious mutant in northeast Mexico. *Acta Hort. (ISHS)* **179**: 373-374

Rayle DL, Cleland R. 1977. Control of plant cell enlargement by hydrogen ions. *Curr Top Dev Biol* **11**: 187-214

Rebrikov DV, Britanova OV, Gurskaya NG, Lukyanov KA, Tarabykin VS, Lukyanov SA. 2000. Mirror orientation selection (MOS): a method for eliminating false positive clones from libraries generated by suppression subtractive hybridization. *Nucleic Acids Res* **28**: E90

Reid JB. 1986. Gibberellin mutants. In: Blonstein AD and King PJ, ed. *Plant Gene Research, a Genetic Approach to Plant Biochemistry*. New York: Springer-Verlag, pp 1-34.

Reid JB. 1993. Plant hormone mutants. *J.Plant Growth Regul.* **12**: 207-226

Reid JB, Ross JJ, Swain SM. 1992. Internode length in Pisum. *Planta* **188**: 462-467

Reik W, Walter J. 2001. Genomic imprinting: parental influence on the genome. *Nat Rev Genet* **2**: 21-32

Rhoades MM. 1938. Effect of the Dt gene on the mutability of the a1 allele in maize. *Genetics* **23**: 377-397

Riggs AD. 1975. X inactivation, differentiation, and DNA methylation. *Cytogenet Cell Genet* **14**: 9-25

Riley R. 1960. The diploidization of polyploids wheat. *Heredity* **15**: 407-429

Robertson DS. 1989. Understanding the relationship between qualitative and quantitative genetics. In: Helentjaris Tand Burr B, ed. *Development and application of molecular markers to problems in plant genetics*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, pp81-87.

Rock CD, Zeevaart JA. 1991. The aba mutant of Arabidopsis thaliana is impaired in epoxy-carotenoid biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 7496-7499

Rodrigo MJ, Marcos JF, Alferez F, Mallent MD, Zacarias L. 2003. Characterization of Pinalate, a novel Citrus sinensis mutant with a fruit-specific alteration that results in yellow pigmentation and decreased ABA content. *J Exp Bot* **54**: 727-738

Ronen G, Cohen M, Zamir D, Hirschberg J. 1999. Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: expression of the gene for lycopene epsilon-cyclase is down-regulated during ripening and is elevated in the mutant Delta. *Plant J* **17**: 341-351

Rosahl SP, Eckes SP, Schell J, Willmitzer L. 1985. Organ-specific gene expression in potato: Isolation and characterization of tuber-specific cDNA sequences. *Molecular and General Genetics* **202**: 368-373.

Rosenberg SM, Hastings PJ. 2004. Genomes: worming into genetic instability. *Nature* **430**: 625-626

Ross JJ. 1994. Recent advances in the study of gibberellin mutants. *Plant Growth Regulation* **15**: 193-206

- Ross JJ, O'Neill DP, Rathbone DA. 2003.** Auxin-Gibberellin Interactions in Pea: Integrating the Old with the New. *Journal of Plant Growth Regulation* **22**: 99-108
- Ruan Y, Gilmore J, Conner T. 1998.** Towards Arabidopsis genome analysis: monitoring expression profiles of 1400 genes using cDNA microarrays. *Plant J* **15**: 821-833
- Rutherford SL, Lindquist S. 1998.** Hsp90 as a capacitor for morphological evolution. *Nature* **396**: 336-342

S

- Sachs R, Bretz C, Lang A. 1959a.** Shoot Histogenesis: The Early Effects of Gibberellin Upon Stem Elongation in Two Rosette Plants. *American Journal of Botany* **46**: 376-384
- Sachs RM, Bretz C, Lang A. 1959b.** Cell division and gibberellic acid. *Exp Cell Res* **18**: 230-244
- Sachs R, Lang A, Bretz C, Roach J. 1960.** Shoot Histogenesis: Subapical Meristematic Activity in a Caulescent Plant and the Action of Gibberellic Acid and Amo-1618. *American Journal of Botany* **47**: 206-266
- Sachs R. 1965.** Stem elongation. *Annu Rev Plant Physiol.* **16**: 73-96
- Sachs R. 1968.** Control of Intercalary Growth in the Scape of Gerbera by Auxin and Gibberellic Acid. *American Journal of Botany* **55**: 62-68
- Santoni V, Delarue M, Caboche M, Bellini C. 1997.** A comparison of two-dimensional electrophoresis data with phenotypical traits in Arabidopsis leads to the identification of a mutant (cri1) that accumulates cytokinins. *Planta* **202**: 62-69
- Sarry JE, Sommerer N, Sauvage FX, Bergoin A, Rossignol M, Albagnac G, Romieu C. 2004.** Grape berry biochemistry revisited upon proteomic analysis of the mesocarp. *Proteomics* **4**: 201-215
- Satina S, Blakeslee AF, Avery AG. 1940.** Demonstration of the Three Germ Layers in the Shoot Apex of Datura by Means of Induced Polyploidy in Periclinal Chimeras. *American Journal of Botany* **27**: 895-905
- Sato T, Iwatsubo T, Takahashi M, Nakagawa H, Ogura N, Mori H. 1993.** Intercellular localization of acid invertase in tomato fruit and molecular cloning of a cDNA for the enzyme. *Plant Cell Physiol* **34**: 263-269
- Sax K. 1923.** The association of size differences with seed coat pattern and pigmentation in *Phaseolus vulgaris*. *Genetics* **8**: 552-560
- Saze H, Mittelsten Scheid O, Paszkowski J. 2003.** Maintenance of CpG methylation is essential for epigenetic inheritance during plant gametogenesis. *Nat Genet* **34**: 65-69
- Schaefer DG, Zryd JP. 1997.** Efficient gene targeting in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant J* **11**: 1195-1206
- Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. 1995.** Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* **270**: 467-470
- Schmutte C, Yang AS, Beart RW, Jones PA. 1995.** Base excision repair of U:G mismatches at a mutational hotspot in the p53 gene is more efficient than base excision repair of T:G mismatches in extracts of human colon tumors. *Cancer Res* **55**: 3742-3746
- Schnelle F. 1955.** *Pflanzenphänologie*. Leipzig, Germany: Akademische Verlagsgesellschaft
- Schoof H, Lenhard M, Haecker A, Mayer KF, Jurgens G, Laux T. 2000.** The stem cell population of Arabidopsis shoot meristems is maintained by a regulatory loop between the CLAVATA and WUSCHEL genes. *Cell* **100**: 635-644
- Schuchhardt J, Beule D, Malik A, Wolski E, Eickhoff H, Lehrach H, Herzel H. 2000.** Normalization strategies for cDNA microarrays. *Nucleic Acids Res* **28**: E47
- Sera GH, Sera T, Androcioi Filho A, Azevedo J, Altéia M, Colombo L. 2001.** Herança da característica Erecta (Er) da ramificação plagiotropica e sua relação com o vigor vegetativo em população F₂ do cruzamento 'Catuai Erecta' x 'IAPAR-59'. ed. *Simposio de pesquisa dos cafés do brasil, 2. 2001, Victoria-ES. Resumos...* Brasília: Embrapa Café, p.94.
- Sharp PM, Li WH. 1989.** On the rate of DNA sequence evolution in Drosophila. *Journal of Molecular Biology* **28**: 398-402
- Shen JC, Rideout WM, 3rd, Jones PA. 1994.** The rate of hydrolytic deamination of 5-methylcytosine in double-stranded DNA. *Nucleic Acids Res* **22**: 972-976

- Shizuya H, Birren B, Kim U-J, Mancino V, Slepak T, Tachiiri Y, Simon M. 1992.** Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**: 8794–8797
- Skoog F, Armstrong DJ. 1970.** Cytokinins. *Annual Review of Plant Physiology* **21**: 359-384
- Slatyer R. 1967.** *Plant-water relations*. New York: Academic press. 366 pp.
- Söding H. 1925.** *Werden von der Spitze der Haferkoleoptile Wuchshormone gebildet*
- Sommer HE, Brown CL, Wetzstein HY. 1999b.** The influence of intermittent soil drying on growth, cell number, and final cell length in the pith of mature internodes in *Helianthus annuus* L., and *Liquidambar styraciflua* L. *Plant and soil* **210**: 51-59
- Sommer HE, Wetzstein HY, Brown CL. 1999a.** Shoot growth and histological response of dwarf sweetgum to gibberellin. *Journal of horticultural Science & Biotechnology* **74**: 618-621
- Soppe WJ, Jacobsen SE, Alonso-Blanco C, Jackson JP, Kakutani T, Koornneef M, Peeters AJ. 2000.** The late flowering phenotype of *fwa* mutants is caused by gain-of-function epigenetic alleles of a homeodomain gene. *Mol Cell* **6**: 791-802
- Southern EM. 1996.** DNA chips: analysing sequence by hybridization to oligonucleotides on a large scale. *Trends Genet* **12**: 110-115
- Steeves T, Sussex I. 1989.** *Patterns in plant development*: Cambridge University Press. 408 pp.
- Steiger L, Nagai C, Moore H, Morden W, Osgood V, Ming R. 2002.** AFLP analysis of genetic diversity within and among *Coffea arabica* cultivars. *Theor Appl Genet* **105**: 209-215
- Sterrenburg E, Turk R, Boer JM, van Ommen GB, den Dunnen JT. 2002.** A common reference for cDNA microarray hybridizations. *Nucleic Acids Res* **30**: e116
- Stoffelen, P. 1998.** *Coffea* and *Psilanthus* in tropical Africa: a systematic and palynological study, including a revision of the West and Central African species. *PhD dissertation*, Katholieke Universiteit Leuven.
- Stokes TL, Kunkel BN, Richards EJ. 2002.** Epigenetic variation in *Arabidopsis* disease resistance. *Genes Dev* **16**: 171-182
- Suarez-Lopez P, Wheatley K, Robson F, Onouchi H, Valverde F, Coupland G. 2001.** CONSTANS mediates between the circadian clock and the control of flowering in *Arabidopsis*. *Nature* **410**: 1116-1120
- Sung S, Amasino RM. 2004.** Vernalization in *Arabidopsis thaliana* is mediated by the PHD finger protein VIN3. *Nature* **427**: 159-164
- Sussex I, Kerk N. 2001.** The evolution of plant architecture. *Current opinion in plant biology* **4**: 33-37
- Sussex IM. 1989.** Developmental programming of the shoot meristem. *Cell* **56**: 225-229
- Sutcliffe JG, Foye PE, Erlander MG, Hilbush BS, Bodzin LJ, Durham JT, Hasel KW. 2000.** TOGA: an automated parsing technology for analyzing expression of nearly all genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 1976-1981
- Sybenga J. 1960.** Genetics and cytology of *Coffea*. A literature review. *Turrialba* **10**: 83-137

T

- Tal M, Nevo Y. 1973.** Abnormal stomatal behavior and root resistance, and hormonal imbalance in three wilted mutants of tomato. *Biochemical Genetics* **8**: 291-300
- Tamaru H, Selker EU. 2001.** A histone H3 methyltransferase controls DNA methylation in *Neurospora crassa*. *Nature* **414**: 277-283
- Tanksley SD, Ganai MW, Prince JP, de Vicente MC, Bonierbale MW, Broun P, Fulton TM, Giovannoni JJ, Grandillo S, Martin GB, et al. 1992.** High density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. *Genetics* **132**: 1141-1160
- Tariq M, Saze H, Probst AV, Lichota J, Habu Y, Paszkowski J. 2003.** Erasure of CpG methylation in *Arabidopsis* alters patterns of histone H3 methylation in heterochromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 8823-8827

Thimann KV. 1974. Fifty years of plant hormone research. *Plant Physiol.* **54**: 450-453

Thompson AJ, Tor M, Barry CS, Vrebalov J, Orfila C, Jarvis MC, Giovannoni JJ, Grierson D, Seymour GB. 1999. Molecular and genetic characterization of a novel pleiotropic tomato-ripening mutant. *Plant Physiol* **120**: 383-390

Tian T. 2004. *Arabidopsis thaliana* histone deacetylase 1 (*ATHD1*) and epigenetic regulation. Texas A&M University, Texas. 192 pp.

Tör M, Manning K, King GJ, Thompson AJ, Jones GH, Seymour GB, Armstrong SJ. 2002. Genetic analysis and FISH mapping of the Colourless non-ripening locus of tomato. *Theor Appl Genet* **104**: 165-170

Thuillet AC, Bru D, David J, Roumet P, Santoni S, Sourdille P, Bataillon T. 2002. Direct Estimation of Mutation Rate for 10 Microsatellite Loci in Durum Wheat, *Triticum turgidum* (L.) Thell. ssp *durum* desf. *Molecular Biology and Evolution.* **19**:122-125

U

Ushijima T, Watanabe N, Okochi E, Kaneda A, Sugimura T, Miyamoto K. 2003. Fidelity of the methylation pattern and its variation in the genome. *Genome Res* **13**: 868-874

V

Vaast P, Bertrand B, Perriot JJ, Guyot B, Gérard M. 2006. Fruit thinning and shape improve bean characteristics and beverage quality of coffee (*Coffea arabica* L.) under optimal conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **86**: 197-204

Velculescu VE, Zhang L, Vogelstein B, Kinzler KW. 1995. Serial analysis of gene expression. *Science* **270**: 484-487

Verica JA, Maximova SN, Strem MD, Carlson JE, Bailey BA, Gultinan MJ. 2004. Isolation of ESTs from cacao (*Theobroma cacao* L.) leaves treated with inducers of the defense response. *Plant Cell Rep* **23**: 404-413

Vowles EJ, Amos W. 2004. Evidence for widespread convergent evolution around human microsatellites. *PLoS Biol* **2**: E199

Vries (De) H. 1901. *Die Mutation theorie.* Veit, Leipzig, Germany. 304p pp.

W

Waddington CH. 1942. The Epigenotype. *Endeavour* **1**: 18-20

Walbot V, Britt AB, Luehrsen K, McLaughlin M, Warren C. 1988. Regulation of mutator activities in maize. *Basic Life Sciences* **47**

Walbot V. 1999. UV-B damage amplified by transposons in maize. *Nature* **397**: 398-399

Wang TL, Horgan R, Cove D. 1981. Cytokinins from the Moss *Physcomitrella patens*. *Plant Physiology* **68**: 735-738

Wardlaw CW. 1957. On the organization and reactivity of the shoot apex in vascular plants. *American Journal of Botany* **44**: 176-185

Wasinger VC, Cordwell SJ, Cerpa-Poljak A, Yan JX, Gooley AA, Wilkins MR, Duncan MW, Harris R, Williams KL, Humphery-Smith I. 1995. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: Mycoplasma genitalium. *Electrophoresis* **16**: 1090-1094

Watt DA. 2003. Aluminium-responsive genes in sugarcane: identification and analysis of expression under oxidative stress. *J Exp Bot* **54**: 1163-1174

Weigel D, Jurgens G. 2002. Stem cells that make stems. *Nature* **415**: 751-754

Weller JL, Ross JJ, Reid JB. 1994. Gibberellins and phytochrome regulation of stem elongation in pea. *Planta* **192**: 489-496

- Welsh J, Chada K, Dalal SS, Cheng R, Ralph D, McClelland M. 1992.** Arbitrarily primed PCR fingerprinting of RNA. *Nucleic Acids Res* **20**: 4965-4970
- Went WF. 1928.** Wuchsstoff und Wachstum. *Recl. Trav. Bot. Neerland* **25**: 1-116
- Wessler SR. 1996.** Turned on by stress. Plant retrotransposons. *Curr Biol* **6**: 959-961
- Wigler M, Levy D, Perucho M. 1981.** The somatic replication of DNA methylation. *Cell* **24**: 33-40
- Wildsmith SE, Elcock FJ. 2001.** Microarrays under the microscope. *Mol Pathol* **54**: 8-16
- Wisman E, Ohlrogge J. 2000.** Arabidopsis microarray service facilities. *Plant Physiol* **124**: 1468-1471
- Wright D, McConaughay KDM. 2002.** Interpreting phenotypic plasticity: the importance of ontogeny. *Plant Species Biology* **17**: 119-131
- Wu C, Morris JR. 2001.** Genes, genetics, and epigenetics: a correspondence. *Science* **293**: 1103-1105

Y

- Yamamoto M, Mukai, Y. 1995.** *Physical mapping of ribosomal RNA genes in Aegilops and Triticum*. Presented at Proc. 8th Ont. Wheat Genet. Symp, Beijing
- Yamamoto T, Kuboki Y, Lin SY, Sasaki T, Yano M. 1998.** Fine mapping of quantitative trait loci Hd-1, Hd-2 and Hd-3, controlling heading date of rice, as single Mendelian factors. *Theor. Appl. Genet.* **97**: 37-44
- Yamamuro C, Ihara Y, Wu X, Noguchi T, Fujioka S, Takatsuto S, Ashikari M, Kitano H, Matsuoka M. 2000.** Loss of function of a rice brassinosteroid insensitive1 homolog prevents internode elongation and bending of the lamina joint. *Plant Cell* **12**: 1591-1606
- Yano M, Katayose Y, Ashikari M, Yamanouchi U, Monna L, Fuse T, Baba T, Yamamoto K, Umehara Y, Nagamura Y, Sasaki T. 2000.** Hd1, a major photoperiod sensitivity quantitative trait locus in rice, is closely related to the Arabidopsis flowering time gene CONSTANS. *Plant Cell* **12**: 2473-2484
- Yen HC, Lee S, Tanksley SD, Lanahan MB, Klee HJ, Giovannoni JJ. 1995.** The tomato Never-ripe locus regulates ethylene-inducible gene expression and is linked to a homolog of the Arabidopsis ETR1 gene. *Plant Physiol* **107**: 1343-1353

Z

- Zhu T, Wang X. 2000.** Large-Scale Profiling of the Arabidopsis Transcriptome. *Plant Physiology* **124**: 1472-1476
- Zien A, Aigner T, Zimmer R, Lengauer T. 2001.** Centralization: a new method for the normalization of gene expression data. *Bioinformatics* **17 Suppl 1**: S323-331
- Zobel AM. 1989.** Origin of Nodes and Internodes in Plant Shoots. II. Models of Node and Internode Origin from One Layer of Cells. *Annals of Botany* **63**: 209-220

*Il est une liqueur au poète plus chère,
 Qui manquait à Virgile et qu'adorait Voltaire ;
 C'est toi, divin Café, dont l'aimable liqueur
 Sans altérer la tête épanouit le cœur.
 Aussi, quand mon palais est émoussé par l'âge,
 Avec plaisir encor je goûte ton breuvage.
 Que j'aime à respirer ton nectar précieux !
 Nul n'usurpe chez moi ce soin délicieux.
 Sur le réchaud brûlant moi seul tournant ta graine.
 A l'or de ta couleur fait succéder l'ébène ;
 Moi seul contre la noix, qu'arment ses dents de fer,
 Je fais en le broyant crier ton fruit amer ;
 Charmé de ton parfum, c'est moi seul qui dans l'onde
 Infuse à mon foyer ta poussière féconde ;
 Qui tour à tour calmant, excitant tes bouillons,
 Suis d'un œil attentif tes légers tourbillons.*

Annexes

*Enfin, de ta liqueur lentement reposée,
 Dans le vase fumant la lie est déposée ;
 Ma coupe, ton nectar, le miel américain,
 Que du suc des roseaux exprima l'Africain,
 Tout est prêt : du Japon l'émail reçoit tes ondes,
 Et seul tu réunis les tributs des deux mondes.
 Viens donc, divin nectar, viens donc, inspire-moi ;
 Je ne veux qu'un désert, mon Antigone et toi.
 A peine ai-je senti ta vapeur odorante,
 Soudain de ton climat la chaleur pénétrante
 Réveille tous mes sens, sans trouble, sans chaos,
 Mes pensers plus nombreux accourent à grands flots.
 Mon idée était triste, aride, dépouillée ;
 Elle rit, elle sort, richement habillée,
 Et je crois, du génie éprouvant le réveil,
 Boire dans chaque goutte un rayon du soleil.*

L'Abbé Delille dans Dictionnaire de botanique, nouvelle encyclopédie théologique, tome huitième. J-P Migne Editeur aux ateliers catholiques rue Ambroise au petit-Montrouge. 1851. Ecrit par M.L'Abbé Migne.

ANNEXE 1 : Protocole AFLP

1. Digestion de l'ADN génomique

L'ADN génomique est digéré par deux enzymes de restriction (endonucléases), l'une à 6 bases *EcoRI* et l'autre à 4 bases *MseI*. Les sites de restriction de ces enzymes sont respectivement 5'...G/AATTC...3' et 5'...T/TAA...3'.

La solution de digestion est préparée dans un tube eppendorf de 0,5 ml et comprend 5 µl d'ADN à 50 ng/µl, 5 µl de tampon 5X spécifique de l'enzyme T4 ligase, deux unités de *EcoRI* 10u/µl, deux unités de *MseI* 5u/µl et de l'eau AFLP (qsp 25µl). La réaction de digestion se fait à 37°C pendant 2 heures. Les enzymes sont ensuite inactivées à 70°C pendant 15 minutes.

2. Ligation des adaptateurs

Des courts fragments d'ADN double brin (adaptateurs) spécifiques des sites de coupure *EcoRI* (adaptateur I) et *MseI* (adaptateur II) sont ajoutés aux extrémités des fragments d'ADN digéré. La solution de ligation comprend : les 25 µl d'ADN digéré, 1 µl de chaque adaptateur, une unité de T4 ligase, 5 µl de tampon de la T4 ligase et 17 µl d'eau AFLP (volume final de 50 µl). La réaction de ligation se fait dans un thermocycleur à 37°C pendant 3 heures. La ligase est ensuite dénaturée à 60°C pendant 10 minutes. La solution de ligation est alors diluée 10 fois avec de l'eau AFLP ou du tampon TE.

3. Pré-amplification ou amplification pré-sélective

Les fragments d'ADN sont soumis à une première amplification en utilisant dans une même réaction des amorces *EcoRI* et *MseI*. Chaque amorce est un oligonucléotide complémentaire des séquences de l'adaptateur et du site de restriction correspondants. Il est prolongé en 3' (vers l'intérieur du fragment à amplifier) par un seul nucléotide, l'adénine pour les amorces *EcoRI* et la cytosine pour les amorces *MseI*.

La réaction de pré-amplification (amplification pré-sélective) se fait dans un tube eppendorf de 0,5 ml. Le mélange réactionnel est composé de 5 µl de la solution d'ADN ayant subi la ligation et diluée au 1/10, 0,5 µl d'amorce *EcoRI* + A à 150 ng/µl, 0,5 µl d'amorce *MseI* + C à 150 ng/µl, 2 µl de dNTPs (5mM), 5 µl de tampon 10X Promega, 5 µl de MgCl₂, 0,2 µl de Taq polymérase 5 u/µl et 45 µl d'eau AFLP (volume final 50 µl). Le mélange est homogénéisé au vortex. 20 cycles de PCR sont effectués selon la programmation 30 sec à 94°C, 1 min à 56°C et 1 min à 72°C. Les échantillons ainsi pré-amplifiés sont dilués au 1/30.

4. Marquage au 33P

Le marquage au ³³P consiste en la phosphorylation des extrémités 5' des amorces *EcoRI* par α³³P ATP (Amersham, Réf. : AH9968). L'amorce *EcoRI* est prolongée à son extrémité 3' par trois nucléotides arbitraires (la première étant l'adénine) qui serviront dans l'amplification sélective. Dans un tube eppendorf de 0,5 ml et pour 50 échantillons, le mélange réactionnel est composé de 9 µl d'amorce *EcoRI* à 27,5 ng/µl, 2,5 µl de tampon 10X Kinase Appligène, 1 µl de T4 polynucléotide Kinase Appligène (10 u/µl), 7,5 µl d'eau AFLP et 5 µl de ³³P (10 mCu/µl). Cette solution (Mix 1) est bien mélangée par tapotement et au pulse. La réaction de marquage se fait dans un thermocycleur à 37°C pendant 3 heures. La ligase est ensuite dénaturée à 70°C pendant 10 minutes et la solution est conservée à 4°C.

5. Amplification

Les produits de la pré-amplification subissent une deuxième PCR au cours de laquelle, on utilise l'amorce *Eco* RI préalablement marquée au ³³P et une amorce *Mse*I prolongée en 3' par trois bases arbitraires dont la première est la cytosine.

Le mélange d'amplification se fait dans un tube eppendorf de 0,5 ml et comprend pour une solution mère pour 50 échantillons : 120 µl de tampon 10X Promega, 48 µl de dNTPs (5mM), 120 µl de MgCl₂ (25 mM), 6 µl de Taq polymérase Promega (5 u/µl), 20 µl d'amorce *Mse*I (100 ng/µl), 561 µl d'eau AFLP et 25 µl du Mix. A 15 µl de solution mère ainsi préparée, on ajoute 5 µl d'ADN pré-amplifié et dilué au 1/30. Le mélange est bien homogénéisé au vortex et par pulse. La réaction d'amplification se déroule selon le programme PCR suivant : 30 sec à 94°C, 30 sec à 65°C, 1 min à 72°C (13 cycles avec -0.7°C par cycle). Ensuite 33 autres cycles PCR sont réalisés comme suit : 94°C pendant 30 sec, 56°C pendant 30 sec et 72°C pendant 1 min. A la fin de la réaction d'amplification, 20 µl de bleu d'arrêt sont ajoutés à chaque tube et les enzymes sont dénaturées à 95°C pendant 5 minutes. La solution peut alors être conservée au congélateur à -20 °C.

ANNEXE 2 : Electrophorèse sur gel d'acrylamide

1. Préparation et montage des plaques

Les plaques de verre sont soigneusement lavées à l'eau et nettoyées à l'alcool éthylique. La face interne de la petite plaque est ensuite traitée avec un répulsif, vendu dans le commerce sous l'appellation « anti-pluie ». Cette précaution permet au gel à la fin de la migration, de ne pas adhérer à la petite plaque. Après le séchage du répulsif (5 minutes), deux espaceurs sont disposés le long de la grande plaque. La petite plaque est ensuite posée pardessus, la face traitée vers l'intérieur. Ce montage est maintenu d'abord par des pinces, puis par un boudin en caoutchouc.

2. Coulage du gel

Dans un erlenmeyer à bec, sont versés 80 ml d'une solution d'acrylamide à 6%, 300 µl de solution de Persulfate d'ammonium (APS) et 30 µl de Temed. La solution est bien agitée et coulée soigneusement (sans bulle d'air) entre les deux plaques de verre. Un pré-peigne sans dents est aussitôt placé sur le bord du gel et maintenu par au moins deux pinces. Une bonne polymérisation requiert au moins 1h 30min.

3. Dépôt et migration des échantillons

Après la polymérisation du gel, le boudin de caoutchouc et le pré-peigne sont retirés. Les plaques de verre sont lavées à l'eau chaude pour être débarrassées des excédents d'acrylamide. Le montage est ensuite placé sur la cuve à électrophorèse. 1 litre de tampon de migration (TBE 1X) est reparti entre les deux compartiments de la cuve. Le gel est préchauffé à 50 W pendant 15 à 20 minutes. Avant la pose du peigne, l'urée est chassée à l'aide d'une seringue contenant du TBE 1X permettant ainsi le nettoyage de la ligne de base aménagée par le pré-peigne. 3,5 µl de solution d'ADN amplifié et dénaturé à 95°C pendant 5 minutes, sont déposés dans les puits aménagés entre les dents du peigne. Pour éviter les défauts de migration liés aux bordures du gel (effet de bordure), 3,5 µl de bleu d'arrêt sont déposés dans le premier et le dernier puits. La migration se fait pendant environ 2h 20 min à 55 W.

4. Révélation du gel

Après la migration, le peigne et les espaceurs sont retirés et la petite plaque est délicatement séparée du gel. Le gel qui reste solidaire de la grande plaque est plongé dans une cuve contenant la solution de fixation (200 ml d'alcool éthylique, 100 ml d'acide acétique glacial et 700 ml d'eau permutée). Après 30 minutes de fixation, le gel est transféré sur du papier Wattman découpé à la taille de la petite plaque de verre. Le gel est recouvert avec un film plastique Saran avant d'être mis à sécher à 80°C sous vide pendant 30 minutes.

Dans une chambre obscure sous une faible lumière rouge, le film plastique Saran est retiré et le gel solidaire du papier Wattman, est placé dans une cassette pour exposition. Un film autoradiographique Kodak (Biomax) est ensuite posé sur le gel et la cassette est aussitôt refermée. Après 3 jours d'exposition, le film est retiré de la cassette en chambre noire. Il est immédiatement plongé dans une solution de révélation. Dès que les bandes apparaissent, le film est retiré et plongé dans une solution de fixation. Il est ensuite retiré et abondamment rincé à l'eau du robinet avant sa mise au séchage à l'air ambiant.

ANNEXE 3 : Solutions pour extraction des ARN totaux

Sol. A (Thiocyanate de guanidine 5 M)

Pouvoir dissociant,

$\text{CH}_5\text{N}_3 \cdot \text{HSCN}$ 118.2 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

472.64 gr de GTC

8 ml de NaAc 3M pH6

Eau mQ DEPC qsp 800 ml

Autoclaver à 120°C 20 min

Solution B (N- Lauroylsarcosine 20%)

Détergent puissant permettant la lyse des membranes,

$\text{C}_{15}\text{H}_{29}\text{NO}_3\text{Na}$ 293.4 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

50 gr de sarcosine

Eau mQ DEPC qsp 250 ml

Autoclaver à 120°C 20 min

Solution C (Polyvinyl pyrrolidone 10%)

Permet de piéger les polyphénols

25 gr de PVP ($360 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$)

Eau mQ DEPC qsp 250 ml

Autoclaver à 120°C 20 min

Acide ascorbique 500 mM

Rôle anti-oxydant

Vitamine C 176.1 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

3.4 gr d'acide ascorbique

Eau mQ DEPC qsp 40 ml

Tampon d'extraction

192 ml de Solution A

10.56 ml de Solution B

21.6 ml de Solution C

9.6 ml d'acide ascorbique 500 mM

7.2 ml de B mercaptoéthanol (à manipuler sous hotte, rôle *anti-oxydant*)

Ces différents produits associés permettent d'assurer l'inhibition des RNases endogènes ou contaminantes, la dénaturation des protéines, la précipitation sélective des polysaccharides et empêche l'oxydation des composés phénoliques très nombreux dans les feuilles de café

Coussin de Chlorure de césium 5.7 M

CsCl 168.4 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

239.92 gr de CsCl

2 ml de NaAc 3M, pH6

Eau mQ DEPC qsp 250 ml

Autoclaver à 120°C à 20 min

Acétate de sodium 3M pH5,2

$\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2\text{Na}$ 82.03 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

49.2 gr d'acétate de sodium

150 ml d'eau mQ-DEPC

Ajuster à pH5,2 avec de l'acide acétique

Eau mQ-DEPC qsp 200 ml

Autoclaver à 120°C à 20 min

ANNEXE 4 : Protocole de la construction de banques soustractives

1. Principe

Le kit PCR-Select cDNA Subtraction (Clontech) a été utilisé pour cette expérience. Cette méthode d'Hybridation Suppressive Soustractive (HSS) a été décrite à l'origine par les équipes de Paul Siebert de la société Clontech (Palo Alto, Californie) (Diatchenko *et al.*, 1996) et d'Eugène Sverdlov, de l'Institut de chimie bio-organique de Moscou (Russie). Cette technique est basée sur l'amplification sélective de séquences exprimées différemment (méthode soustractive) et prévient l'amplification d'ADNc indésirables (méthode suppressive). Elle permet ainsi un enrichissement de la banque en molécules cibles rares.

La technique est réalisée à l'aide du kit « PCR-select cDNA Subtraction » (Clontech). La stratégie consiste à produire, à partir d'ARN totaux, des ADNc qui sont digérés par l'enzyme *Rsa* I. Une partie de ces ADNc constitueront les ADNc *driver* et l'autre partie, ligués à deux types d'adaptateurs, constituera les ADNc *tester*. (figure)

Deux soustractions sont effectuées pour deux populations d'ARNm donnés : la soustraction *forward*, notée « A » (le *tester* issu du Bourbon pointu est soustrait avec le *driver* issu d'Arabica), et la soustraction *reverse*, notée « B » (le *tester* issu d'Arabica est soustrait avec le *driver* issu du Bourbon pointu). Ainsi la banque *forward* ne devrait contenir que les ADNc spécifiques ou surexprimés chez le Bourbon pointu, tandis que ceux uniquement présents ou surexprimés chez l'Arabica et absent chez le Bourbon pointu constitueraient la banque *reverse*.

2. Synthèse des ADNc

La synthèse des brins d'ADNc est réalisée avec le kit « SMART PCR cDNA Synthesis » de Clontech (figure). Cette méthode, basée sur l'amplification PCR, permet de produire des ADNc de bonne qualité directement à partir de très peu d'ARN totaux..

Les banques SSH ont été construites à partir d'ARN totaux des parties aériennes de Bourbons pointus et de Bourbons âgés de deux mois (cf. photos), quand les deux plus jeunes feuilles apparaissent au-dessus des cotylédons. En prenant un stade si précoce, la technique de la SSH permet de mettre d'isoler des gènes différemment exprimés très tôt et ainsi de mettre en évidence le maximum « d'effets primaires » de la mutation pléiotropique. Déjà, à ce stade, une différence phénotypique (taille des hypocotyles) pouvait être observée, laissant d'ores et déjà préjuger d'une expression différentielle de gène(s).

Une amorce oligo(dT) modifiée « 3' SMART CDS primer II A » est utilisée pour la synthèse du premier brin à partir de 1 µg d'échantillon d'ARN totaux. Un microlitre d'amorce « 3' SMART CDS Primer II A » (10 µM) et 1 µl d'amorce « SMART II A » (10 µM) sont nécessaires à cette synthèse. Lorsque la reverse transcriptase (RT) [PowerScript™ RT à raison de 100 unités] arrive à l'extrémité 5' de l'ARNm, elle ajoute des nucléotides de désoxycytidine (dC) à l'extrémité 3' de l'ADNc. La séquence «SMART II A», qui possède une séquence polyG à son extrémité 3', se fixe alors sur l'extrémité dC du brin d'ADNc, créant ainsi une extension de matrice. La RT continue alors la synthèse, conduisant à la formation d'un ADNc simple brin contenant la séquence SMART CDS Primer II A en 5', suivi de la séquence complémentaire de l'ARNm et de celle de l'adaptateur SMART II A en 3'. Les deux extrémités comprennent ainsi un site spécifique de fixation de l'amorce « 5' PCR Primer IIA » nécessaire pour amplifier l'ADNc par PCR et un site de restriction de l'enzyme *Rsa*I contenu dans les amorces.

Le second brin est synthétisé par PCR dans un thermo-cycleur Perkin-Elmer (PE) 9700 à l'aide d'une seule amorce : la «5' PCR Primer IIA». Cette synthèse s'effectue par la Taq polymérase (Advantage 2 polymerase mix 50 x, Clontech) à partir d'1 µl de solution du premier brin diluée 50 fois. Le nombre de cycles pour la synthèse du second brin doit être optimisé afin de minimiser les amplifications non spécifiques. Un tube « test » subit le nombre maximum de cycles, soit 24 cycles. A partir du 15^{ème} cycle et tous les trois cycles, une fraction de 8 µl de chaque amplification est prélevée, puis analysée sur gel d'agarose. Le nombre de cycles (15+n) pour une amplification optimale est ainsi défini. Les autres tubes stockés à 4°C sont alors placés dans le thermo-cycleur durant ces 15+n cycles. Après cette étape, les ADNc sont purifiés sur membrane de silice à l'aide du kit « Qiaquick PCR Purification » (Qiagen) (annexe).

3. Digestion des ADNc

Les ADNc sont digérés par l'enzyme de restriction *RsaI* (15 unités dans un volume de 360 µl durant 3h à 37 °C). Cette enzyme reconnaît le site GTAC. Elle génère de petits fragments d'ADNc, plus facilement clonables et possédant des extrémités franches nécessaires à l'étape de ligation des adaptateurs. Les petits fragments d'ADNc apportent deux avantages : les longs se replient sur eux-mêmes en formant des complexes limitant les hybridations attendues et la digestion des fragments d'ADNc donne une meilleure représentation des gènes individuels. Après la digestion, les échantillons sont purifiés à l'aide du kit « Qiaquick PCR purification » de Qiagen (annexe), puis précipité à l'éthanol et repris dans 6,7 µl d'eau stérile. Des fractions aliquotes sont prélevées et analysées sur gel d'agarose avant et après chaque étape afin de contrôler le bon déroulement de la digestion.

4. Préparation des ADNc tester : ligation des adaptateurs

Une partie de ces ADNc digérés par *RsaI* constitueront les ADNc *driver*. L'autre partie de ces ADNc, attachés à des adaptateurs, constitueront les ADNc *tester*. Ceux-ci seront séparés en deux sous-populations : l'une sera liée à l'adaptateur 1 et l'autre à l'adaptateur 2R (Annexe). Pour cela, l'enzyme T4 DNA ligase est utilisée à raison de 400 unités par échantillon (composé de 2µl d'ADNc digéré par *RsaI*). Les tubes sont incubés une nuit à 16°C.

5. Normalisation et soustraction

Après dénaturation, chacune des sous-populations d'ADNc *tester* est ensuite hybridée durant six à douze heures à 68 °C avec les ADNc *driver* en excès (cinq fois plus) issus de l'autre population d'ARNm (figure). Ainsi les ADNc fortement représentés et spécifiques à la sous-population *tester* s'hybrident entre eux (normalisation, molécules « b »), les ADNc non spécifiques à cette population s'hybrident avec les ADNc *driver* dénaturés (soustraction, molécules « c ») et enfin les ADNc faiblement représentés et spécifiques à la sous-population *tester* restent sous forme de simple brin (molécules « a »).

Une seconde hybridation, à 68 °C toute une nuit, entre les deux sous-populations traitées, en présence d'ADNc *driver* fraîchement dénaturé, permet l'assemblage des simples brins spécifiques entre eux pour obtenir les double brins recherchés possédant deux adaptateurs différents à chaque extrémité (molécule « e »).

6. Amplification sélective par PCR

Différents types de molécules simple brin ou double brins sont obtenus après normalisation et soustraction. Seules les molécules hybrides de type « e » ayant deux adaptateurs différents correspondent aux ADNc exprimés différemment. Elles pourront être amplifiées exponentiellement. En effet, les molécules « a » et « d » (correspondant aux molécules non hybridées du « driver ») ne sont pas amplifiables et les molécules « c » ne seront pas amplifiées car, sous forme simple brin, elles formeront des structures en boucle, par appariement de séquences communes au niveau de l'adaptateur (structure « pan-like »). La température d'hybridation élevée (66°C) favorise justement la formation de ces structures et sert à éviter les amplifications non spécifiques (figure)

Une première PCR (PCR I) est réalisée avec une amorce commune aux deux adaptateurs « PCR Primer 1 » et « 2R » (annexe IV), à l'aide de l'enzyme « Advantage 2 Taq polymerase mix » (Clontech) et d'un thermocycleur PE 9700. Les réactions sont incubées dans le thermocycleur à 75 °C durant 5min pour l'extension des adaptateurs. Immédiatement après, la PCR I se déroule sur 27 cycles. Un nouveau mélange de réaction est ajouté à 1 µl de ces produits PCR dilués au 1/10^{ème} afin de lancer la seconde PCR (PCR II). La réaction se déroule sur 10 à 12 cycles. Cette PCR II est réalisée avec deux amorces plus internes et spécifiques de chaque adaptateur (*nested primer 1* et *nested primer 2R* », voir annexe IV). Ceci diminue le bruit de fond aspécifique et augmente la quantité globale en ADNc. Ces séquences exprimées différemment sont enrichies pour former au final un pool d'ADNc soustrait qui sera cloné pour former la banque d'ADNc.

Les produits PCR sont ensuite clonés et les plasmides envoyés au séquençage (cf. protocole XX).

ANNEXE 5 : Composition du gel dénaturant pour Northern

*Gel à 1,1% d'environ 100ml

Faire fondre 1.1 gr d'agarose avec 75 ml d'eau DEPC puis laisser refroidir au bain marie (60-70°C)

Ajouter 16.5 ml de formaldéhyde et 9.3 ml de MOPS 10X

MOPS 10X

Acide morpholinopropanesulfonique 0.4M

Na acetate 3H₂O 0.1M

EDTA 10 mM

PH 7.2 avec NaOH

*Préparation des échantillons

Pour un volume final de 10µl

Ajouter 1 volume de Tampon de dénaturation à 1 volume d'ARN

Tampon de dénaturation

Formaldéhyde 35 µl

Formamide 100 µl

MOPS 10X 20 µl

Xylène cyanol saturé 1.5µl

Bleu de bromophénol saturé 1.5 µl

EtBr (2mg/ml) 47 µl

Dénaturer 3 min à 65°C, puis sur glace 5 min

*Migration

Dans du tampon MOPS 1X, 30 min à 50V et 30 min à 100V

ANNEXE 6 :

Tableaux des ESTs regroupées dans les classes 2 et 3 après les tests de Dunnet. A) ESTs de la SSHbp, B) ESTs de la SSHb.

Moy Cbp (respectivement Cb) : moyenne pour la cible de type BP (respectivement B).

Dunnet Cbp (respectivement CB) : valeur du test de Dunnet pour la comparaison de la moyenne Cbp (respectivement Cb) avec les témoins négatifs.

Ratio BP/B : Rapport des valeurs corrigées des signaux obtenus avec les cibles BP sur ceux obtenus avec les cibles B. Il représente la différence d'expression entre les deux variétés.

Symbole de l'EST	Moy Cbp	Dunnet Cbp	Dunnet Cb	Moy Cb	Nom	ratio BP:B	SSH	Classe
CA-S01 001 A10	0,30163	0,00086	0,78868	0,21050	Pas de hit	1,433	SSHbp	3
CA-S01 001 D03	0,30349	0,00010	0,50065	0,27204	101 kDa heat shock protein; HSP101	1,116	SSHbp	3
CA-S01 001 H02	0,00052	0,00052	0,75522	0,13668	<i>pas valide</i>	0,004	SSHbp	3
CA-S01 002 D02	0,35040	0,00008	0,85470	0,19153	Pas de hit	1,829	SSHbp	3
CA-S01 002 F11	0,32161	0,00039	0,87390	0,21593	Rab escort protein -related	1,489	SSHbp	3
CA-S01 004 B07	0,34082	0,00007	0,20303	0,27443	pentatricopeptide repeat-containing	1,242	SSHbp	3
CA-S01 004 E08	1,34694	0,00002	0,91230	0,19411	oxygen-evolving complex related	6,939	SSHbp	3
CA-S01 004 F05	0,29324	0,00159	0,76445	0,21359	patatin-like protein	1,373	SSHbp	3
CA-S01 005 C09	0,31315	0,00066	0,44109	0,28089	cytosolic class II low molecular weight	1,115	SSHbp	3
CA-S01 005 F09	0,36175	0,00010	0,55058	0,29771	ferulate-5-hydroxylase	1,215	SSHbp	3
CA-S01 005 G06	0,29057	0,00160	0,48726	0,31082	<i>OSJNBb0013J13.11</i>	0,935	SSHbp	3
CA-S01 006 A03	0,31460	0,00091	0,88720	0,18252	101 kDa heat shock protein	1,724	SSHbp	3
CA-S01 007 C08	0,29189	0,00035	0,58667	0,20633	50S ribosomal protein L15, chloroplast	1,415	SSHbp	3
CA-S01 008 C06	0,37905	0,00008	0,60294	0,25653	101 kDa heat shock protein; HSP101	1,478	SSHbp	3
CA-S01 008 D01	0,29054	0,00004	0,69760	0,15214	<i>pas valide</i>	1,910	SSHbp	3
CA-S01 009 A02	0,72737	0,00002	0,92211	0,16675	beta-ketoacyl-CoA synthase family	4,362	SSHbp	3
CA-S01 009 C05	0,31728	0,00043	0,36158	0,30117	Pas de hit	1,053	SSHbp	3
CA-S01 009 F09	0,33015	0,00027	0,48127	0,31207	TGACG-sequence specific DNA-	1,058	SSHbp	3
CA-S01 010 C05	0,27193	0,00087	0,33918	0,26962	OSJNBa0027P08.5	1,009	SSHbp	3
CA-S01 010 F01	0,24519	0,00642	0,54678	0,26408	<i>Pas de hit</i>	0,928	SSHbp	3
CA-S01 012 A08	0,36732	0,00009	0,60571	0,28616	Coffea arabica clone CFGA207	1,284	SSHbp	3
CA-S01 012 C02	0,40328	0,00007	0,40951	0,33539	chloroplast lumen common protein	1,202	SSHbp	3
CA-S01 012 D03	0,28578	0,00105	0,51923	0,26957	101 kDa heat shock protein; HSP10	1,060	SSHbp	3
CA-S01_012_G03	2,01325	0,00002	0,99995	0,03097	4-coumarate-CoA ligase	2,000	SSHbp	3

A

B

Nom	Moy Cbp	Dunnet Cbp	Dunnet Cb	Moy Cb	Nom	ratio BP:B	SSH	Classe
CA-S02 002 E01	0,19081	0,75749	0,00254	0,52461	Pas de hit	0,364	SSHb	2
CA-S02 005 C05	0,15750	0,90326	0,00291	0,50372	Pas de hit	0,313	SSHb	2
CA-S02 002 A10	0,39287	0,00199	0,24582	0,39200	photosystem I protein psaH precursor	1,002	SSHb	3
CA-S02 002 C03	0,36531	0,00564	0,98986	0,19556	putative DEAD/DEAH box helicase	1,868	SSHb	3
CA-S02 003 A02	0,41046	0,00060	0,70969	0,24258	LHY protein	1,692	SSHb	3
CA-S02 004 B07	0,37762	0,00442	0,58060	0,31057	IN2-2 protein	1,216	SSHb	3
CA-S02 004 D03	0,36548	0,00758	0,77354	0,28110	Pas valide	1,300	SSHb	3
CA-S02 004 G10	0,42342	0,00055	0,71790	0,28779	SMC1 protein	1,471	SSHb	3
CA-S02 005 B11	0,39833	0,00081	0,35457	0,35507	abscisic stress ripening protein	1,122	SSHb	3
CA-S02 007 C03	0,36012	0,00401	0,88967	0,24455	putative NADPH HC toxin reductase	1,473	SSHb	3
CA-S02 007 D06	0,34745	0,00580	0,81917	0,27338	acetyl-CoA C-acetyltransferase	1,271	SSHb	3
CA-S02 007 E08	0,38481	0,00328	0,92516	0,24395	Pas valide	1,577	SSHb	3
CA-S02 009 G07	0,38509	0,00120	0,40939	0,33044	Pas valide	1,165	SSHb	3
CA-S02 010 A09	0,51814	0,00002	0,87595	0,25665	putative ABC transporter family protein	2,019	SSHb	3
CA-S02 010 G12	0,39364	0,00132	0,98066	0,19617	probable tyrosine-tRNA ligase	2,007	SSHb	3
CA-S02 010 H11	0,45801	0,00010	0,97700	0,21570	expressed protein	2,123	SSHb	3
CA-S02 011 A02	0,37689	0,00180	0,97981	0,19860	Pas de hit	1,898	SSHb	3
CA-S02 012 G03	0,50016	0,00003	0,60954	0,32637	carbonic anhydrase	1,532	SSHb	3

ANNEXE 7 :

Résultats des ANOVA faites sur les ESTs regroupées dans la classes 4 . A) ESTs de la SSHbp, B) ESTs de la SSHb.

Moy Cbp (respectivement Cb) : moyenne pour la cible de type BP (respectivement B).

Bonferroni : Probabilité de se tromper en affirmant la présence d'une différence d'expression entre Bourbon et Bourbon pointu

Ratio BP/B : Rapport des valeurs corrigées des signaux obtenus avec les cibles BP sur ceux obtenus avec les cibles B. Il représente la différence d'expression entre les deux variétés.

« Validation 10^{-3} » : « oui » quand la valeur de la colonne « Bonferroni » est inférieure à 10^{-3}

Symbole de l'EST	Bonferroni	Nom	Moy Cbp	Moy Cb	BP/B	SSH	Validation 10^{-3}
CA-S01 011 D11	<10-8	101 kDa heat shock protein	1,362	2,118	0,643	SSHbp	oui
CA-S01 008 B04	<10-8	heat shock protein	0,359	1,132	0,318	SSHbp	oui
CA-S01 009 E01	<10-8	heat shock protein 18p	1,527	2,491	0,613	SSHbp	oui
CA-S01 009 C01	<10-8	Pas de hit	1,980	2,798	0,708	SSHbp	oui
CA-S01 004 G01	<10-8	Pas de hit	3,121	4,236	0,737	SSHbp	oui
CA-S01 009 B01	<10-8	Pas valide	1,208	2,186	0,553	SSHbp	oui
CA-S01 004 E01	<10-8	Pas valide	1,211	2,098	0,577	SSHbp	oui
CA-S01 011 F07	<10-8	Pas valide	2,692	3,870	0,695	SSHbp	oui
CA-S01 009 C02	<10-8	Pas valide	2,558	3,513	0,728	SSHbp	oui
CA-S01 012 G04	<10-8	Pas valide	2,534	0,867	2,924	SSHbp	oui
CA-S01 010 H02	<10-8	specific tissue protein 2	2,882	1,372	2,101	SSHbp	oui
CA-S01 011 B02	<10-8	Vacuolar processing enzyme precursor	2,316	3,623	0,639	SSHbp	oui
CA-S01 002 B01	<10-8	vacuolar processing enzyme-1a	0,538	1,274	0,422	SSHbp	oui
CA-S01 012 D06	0,000001	vacuolar processing enzyme-3	3,698	4,420	0,837	SSHbp	oui
CA-S01 009 G06	0,000001	DC1.2 homologue	2,328	3,158	0,737	SSHbp	oui
CA-S01 004 F01	0,000014	Pas valide	1,014	1,740	0,583	SSHbp	oui
CA-S01 011 C07	0,000024	dehydration-responsive protein RD22	1,920	2,611	0,735	SSHbp	oui
CA-S01 006 F10	0,000151	DC1.2 homologue	1,649	2,262	0,729	SSHbp	oui
CA-S01 012 E02	0,000235	DC1.2 homologue	1,125	1,712	0,657	SSHbp	oui
CA-S01 004 D05	0,000524	chlorophyll a/b binding protein CP29	2,772	3,431	0,808	SSHbp	oui
CA-S01 010 F09	0,001196	Pas valide	1,185	1,766	0,671	SSHbp	
CA-S01 007 D11	0,001475	RelA-SpoT like protein RSH1	1,560	2,120	0,736	SSHbp	
CA-S01 003 F10	0,001693	photosystem II 47 kDa protein	2,330	2,951	0,790	SSHbp	
CA-S01 005 C07	0,001709	DC1.2 homologue	1,107	1,678	0,659	SSHbp	
CA-S01 007 E08	0,002190	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein	1,692	2,211	0,765	SSHbp	
CA-S01 012 E07	0,002229	phosphogluconate dehydrogenase	0,561	1,146	0,489	SSHbp	
CA-S01 009 D09	0,002447	Pas valide	0,891	1,415	0,630	SSHbp	

A

CA-S01_006_A06	0,002682	putative alcohol dehydrogenase	1,733	1,213	1,428	SSHbp	
CA-S01_008_B06	0,003477	Pas valide	1,468	2,037	0,721	SSHbp	
CA-S01_004_H02	0,006351	Pas valide	2,777	3,281	0,846	SSHbp	
CA-S01_003_B07	0,008533	expressed protein	2,453	3,002	0,817	SSHbp	
CA-S01_003_F01	0,010143	Pas de hit	1,117	0,604	1,848	SSHbp	
CA-S01_005_G01	0,010473	Pas de hit	2,153	2,643	0,815	SSHbp	
CA-S01_011_A07	0,018843	hypothetical protein	0,727	1,219	0,596	SSHbp	
CA-S01_001_C05	0,022301	photosystem II 47 kDa protein	1,609	2,159	0,745	SSHbp	
CA-S01_010_B10	0,024796	heat shock protein	1,333	0,841	1,585	SSHbp	
CA-S01_006_F03	0,034471	transitional endoplasmic reticulum ATPase	1,058	1,507	0,702	SSHbp	
CA-S01_004_A07	0,039212	Pas de hit	2,349	2,854	0,823	SSHbp	
CA-S01_011_H05	0,045708	Galactoside 2-alpha-L-fucosyltransferase	2,239	1,779	1,259	SSHbp	

Symbole de l'EST	Bonferroni	Nom	Moy Cbp	Moy Cb	BP/B	SSH	Validation 10 ⁻³
CA-S02_001_G06	<10-8	mRNA for hydroxyproline-rich glycoprotein	3,001	4,271	0,703	SSHb	oui
CA-S02_002_B06	<10-8	Pas valide	1,954	2,961	0,660	SSHb	oui
CA-S02_003_E08	<10-8	vacuolar processing enzyme-1b	1,857	2,858	0,650	SSHb	oui
CA-S02_001_B12	0,000040	Pas de hit	1,922	2,584	0,744	SSHb	oui
CA-S02_009_D09	0,000176	Pas valide	2,111	2,708	0,780	SSHb	oui
CA-S02_005_F10	0,000181	NADH dehydrogenase subunit J	1,976	2,564	0,771	SSHb	oui
CA-S02_006_E06	0,000213	Pas valide	1,628	2,204	0,739	SSHb	oui
CA-S02_004_F07	0,000468	peroxidase	2,211	2,783	0,794	SSHb	oui
CA-S02_005_C02	0,000906	Pas de hit	2,329	2,883	0,808	SSHb	oui
CA-S02_002_G06	0,001015	Pas de hit	2,540	3,111	0,817	SSHb	
CA-S02_002_B07	0,001780	Pas valide	2,690	3,244	0,829	SSHb	
CA-S02_008_F08	0,002646	Glutamate synthase [NADH], chloroplast precursor	0,909	1,416	0,642	SSHb	
CA-S02_010_G09	0,003365	hypothetical protein 3 - common tobacco chloroplast	2,260	2,865	0,789	SSHb	
CA-S02_009_E12	0,006190	Pas de hit	2,168	2,646	0,820	SSHb	
CA-S02_002_F01	0,006544	Pas de hit	2,148	2,667	0,805	SSHb	
CA-S02_011_C04	0,007786	Pas de hit	2,544	3,034	0,839	SSHb	
CA-S02_005_E02	0,009202	Pas valide	2,273	2,763	0,823	SSHb	
CA-S02_009_E10	0,010982	1,4-alpha-glucan branching enzyme	1,375	1,845	0,745	SSHb	
CA-S02_005_E08	0,011184	putative purple acid phosphatase precursor [Glycine max]	1,432	1,902	0,753	SSHb	
CA-S02_009_E08	0,011468	Oenothera elata subsp. hookeri chloroplast plastome I	2,240	2,709	0,827	SSHb	
CA-S02_010_B05	0,012509	Pas valide	1,541	1,997	0,772	SSHb	

B

CA-S02_007_E06	0,016951	Pas valide	1,826	2,282	0,800	SSHb	
CA-S02_008_F07	0,017056	chlorophyll a/b binding protein CP29	2,337	2,865	0,816	SSHb	
CA-S02_012_D09	0,017643	Pas valide	1,956	2,402	0,815	SSHb	
CA-S02_006_A01	0,019020	hypothetical protein 7 - common tobacco chloroplas	2,275	1,797	1,266	SSHb	
CA-S02_003_D03	0,019116	Pas de hit	0,590	1,037	0,569	SSHb	
CA-S02_006_B04	0,028809	putative ABC transporter family protein	2,690	3,158	0,852	SSHb	
CA-S02_007_G06	0,035605	Pas de hit	2,275	1,716	1,326	SSHb	
CA-S02_009_A06	0,035827	Pas de hit	1,835	2,303	0,797	SSHb	
CA-S02_008_H06	0,046015	Pas de hit	1,058	1,490	0,710	SSHb	
CA-S02_003_C07	0,049207	Pas de hit	1,693	2,123	0,797	SSHb	

Annexe 8 : Stade de développement des prélèvements.

A chaque stade, cinq plantules de chaque variété ont été prélevées, et trois groupes d'organes ont été constitués : la partie aérienne au dessus des cotylédons, l'hypocotyle, et les racines. Pour chacun de ces groupes, une seule extraction d'ARN a été faite. Seuls les ARN issus des partie aériennes ont servis aux différentes analyses.

Tableau : correspondance en le stade de développement et l'âge des plantules, avec indication de l'utilisation faite lors de la thèse des ARN prélevés sur la partie aérienne.

Stade de développement	Age, à partir de la mise en germination	Utilisation	Observations
2	4 mois	Construction des banques SSH	Différence de hauteur des hypocotyles
3	4 mois et demi	Northern	
4	5 mois	RT-semi-quantitative et <i>macro-arrays</i>	Différentiation de la surface foliaire
5	5 mois et demi	Northern	Apparition des 1ere ramifications
7	7 mois et demi	Northern	
8	8 mois	Northern	

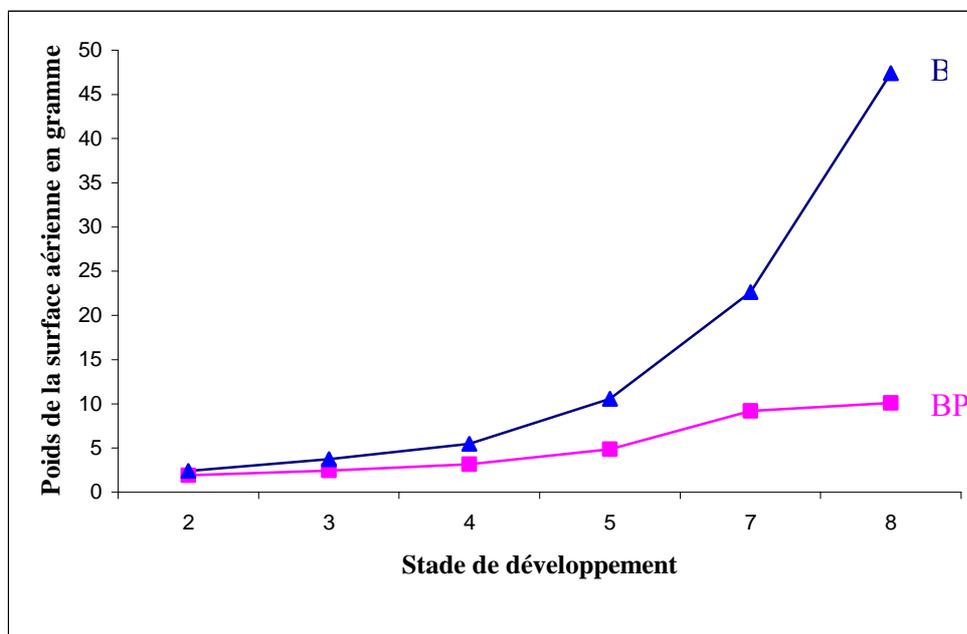


Figure : Evolution du poids de la surface aérienne des cinq plantules au dessus des cotylédons en fonction du stade de développement.



Stade 2



Stade 3



Stade 4



Stade 5



Stade 7

Figure : Illustrations des différences morphologiques au cours du développement des plantules de BP et B.
Stades 2, 3, 5 : vue de face, BP à gauche et B à droite
Stade 4 et 7 : Vue de dessus, BP à gauche et B à droite.

Caractérisation de certains impacts de la mutation *Laurina* chez *Coffea arabica* L. aux niveaux histo-morphologique et moléculaire

Résumé : Le caféier *Coffea arabica* var. *Laurina*, aussi appelé Bourbon Pointu, est apparu à la Réunion suite à une mutation spontanée de la variété Bourbon. Cette mutation *Laurina*, monocus et récessive, a des effets pléiotropiques qui différencie le Bourbon pointu du Bourbon. Au niveau morphologique, elle se caractérise par un nanisme, un port pyramidal et une forme pointue de ses graines. A un niveau moléculaire, la teneur des grains en caféine est fortement réduite. Malgré des caractéristiques agronomiques d'intérêt et d'excellentes qualités organoleptiques, peu d'études sont disponibles sur ce mutant naturel. Ce travail a ainsi pour objectif d'étudier la mutation *Laurina* et d'en caractériser les effets afin de mieux décrire les cascades de réaction mises en place. Il se base sur la comparaison du Bourbon pointu avec sa variété parente Bourbon. Au niveau morphologique, des mesures de croissance végétative ont permis l'analyse et l'explication de la forme pyramidale du mutant. Au niveau histologique, l'étude de l'apex, centre initiateur des organes de surface, et de différents entre-nœuds de l'axe orthotrope a permis d'expliquer l'origine du nanisme en terme de division et d'élongation cellulaire. Des hypothèses quant à l'action de la mutation *Laurina* sur certaines hormones ont été émises à partir des résultats d'application de gibbérelline exogène. Ces études macro et microscopiques ont été couplées au niveau moléculaire à la recherche de gènes différentiellement exprimés entre les deux variétés. La comparaison des transcriptomes des deux variétés à un stade précoce post-cotylédonaire avait pour but la recherche de gènes candidats impliqués dans les premières cascades de réactions menant aux effets pléiotropiques observés. Le clonage différentiel basé sur la méthode SSH (*Hybridation Suppressive Soustractive*) couplé à une étape de tri à haut débit (*macro-array*) a été appliqué à ces fins. L'ensemble des résultats décrit plus précisément les effets pléiotropiques induits par la mutation *Laurina*. La description précise des effets pléiotropiques de la mutation ouvre des pistes quant à la caractérisation moléculaire de la mutation à travers une approche gène candidat.

Mots clés : *Coffea arabica*, Bourbon pointu, mutation *Laurina*, caféier, SSH, *macro-arrays*, transcriptome, apex, méristème apical caulinaire, mèresè, auxèse, plagiotropes, orthotrope.

Characterization of some effects induced by the *Laurina* mutation on *Coffea arabica* L. at the histo-morphological and molecular levels

Abstract: *Coffea arabica* var. *Laurina*, also called Bourbon Pointu, appeared on the island of La Reunion following a spontaneous mutation in the Bourbon variety. Monocus and recessive, the main scientific interest of the *Laurina* mutation concerns its pleiotropic effects. For example, the mutation modifies caffeine content, seed shape and tree architecture. Very little data is available on this natural mutant, although Bourbon pointu presents an excellent cup quality and is of agronomical interest. The aim of the thesis was to better characterize the mutation effects by comparing Bourbon pointu and its parental variety Bourbon. Initial research at a histo-morphological level was used to analysis vegetative growth, and determined the pyramidal shape of Bourbon pointu. Dwarfism of the orthotropic axis was explained in terms of cell size and cell number from studies in the apex and in some internodes. Exogenous application of gibberellins allowed a hypothesis to form concerning effects of the *Laurina* mutation on some hormones. These observations and conclusions led to Bourbon and Bourbon pointu being evaluated at the transcription level, in order to identify candidate genes showing modified expression. Differential cloning with SSH (Suppressive Soustractive Hybridation) method and *macro-arrays* technique allowed the identification of differentially expressed genes. The results described more precisely the pleiotropic effects of the mutation and open the way to the molecular characterization of the *Laurina* mutation based on candidate gene.

Mots clés : *Coffea arabica*, Bourbon pointu, *Laurina* mutation, coffee tree, SSH, *macro-arrays*, transcriptome, apex, Shoot Apical Meristem, meresis, auxesis, plagiotropic axes, orthotropic axes.
