tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

UNIVERSITE BLAISE PASCAL
N° D.U. : 1926

UNIVERSITE D'AUVERGNE
Année 2009

Ecole Doctorale Sciences de la vie et de la santé
N° d'ordre : 499

Thèse

Présentée à l'Université Blaise Pascal
Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITE
(Spécialité : Physiologie et Biologie Moléculaire Végétale)

Présentée et soutenue publiquement par :

Anaïs DUSOTOIT-COUCAUD

le 29 mai 2009

Caractérisations physiologique et moléculaire des transporteurs de sucres et de polyols des cellules laticifères chez *Hevea brasiliensis*, en relation avec la production de latex

Jury

Président :
Pr. Jean-Louis JULIEN, UMR 547 PIAF, Université Blaise Pascal, Aubière

Rapporteurs :
Pr. Marie-Pascale PRUD'HOMME, UMR 950 EVA, Université CBN, Caën
Dr. Rémi LEMOINE, FRE 3091 PHYMOTS, Université de Poitiers, Poitiers

Examinateurs :
Dr. Valérie PUJADE-RENAUD, UMR DAP, CIRAD, Aubière
Dr. Françoise GRANET, CPN, MFP MICHELIN, Clermont-Ferrand
Dr. Hervé CHRESTIN, Dpt Plant Sciences, IRD, Bangkok
Pr. Soulaïman SAKR, UMR SAGAH, INH, Angers **(directeur de thèse)**

INRA Centre de Recherches de Clermont-Ferrand-Theix — Université Blaise Pascal
U.M.R. PIAF

MICHELIN
Une meilleure façon d'avancer

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

A Esteban,

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

UNIVERSITE BLAISE PASCAL
N° D.U. : 1926

UNIVERSITE D'AUVERGNE
Année 2009

Ecole Doctorale Sciences de la vie et de la santé
N° d'ordre : 499

Thèse

Présentée à l'Université Blaise Pascal
Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITE
(Spécialité : Physiologie et Biologie Moléculaire Végétale)

Présentée et soutenue publiquement par :

Anaïs DUSOTOIT-COUCAUD

le 29 mai 2009

Caractérisations physiologique et moléculaire des transporteurs de sucres et de polyols des cellules laticifères chez *Hevea brasiliensis*, en relation avec la production de latex

Jury

Président :
Pr. Jean-Louis JULIEN, UMR 547 PIAF, Université Blaise Pascal, Aubière
Rapporteurs :
Pr. Marie-Pascale PRUD'HOMME, UMR 950 EVA, Université CBN, Caën
Dr. Rémi LEMOINE, FRE 3091 PHYMOTS, Université de Poitiers, Poitiers
Examinateurs :
Dr. Valérie PUJADE-RENAUD, UMR DAP, CIRAD, Aubière
Dr. Françoise GRANET, CPN, MFP MICHELIN, Clermont-Ferrand
Dr. Hervé CHRESTIN, Dpt Plant Sciences, IRD, Bangkok
Pr. Soulaïman SAKR, UMR SAGAH, INH, Angers **(directeur de thèse)**

INRA Centre de Recherches de Clermont-Ferrand-Theix — Université Blaise Pascal
U.M.R. PIAF

MICHELIN
Une meilleure façon d'avancer

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

Caractérisations physiologique et moléculaire des transporteurs de sucres et de polyols des cellules laticifères d'*Hevea brasiliensis*, en relation avec la production de latex

Physiological and molecular characterizations of sugar and polyol transporters of latex cells of *Hevea brasiliensis*, in relation to latex production

Thèse préparée à l' UMR 547 PIAF

UMR INRA-Université Blaise Pascal
Physique et Physiologie Intégrées de l'Arbre Fruitier et Forestier
Université Blaise Pascal
Bâtiment de Biologie Végétale Recherche
24 avenue des Landais
63177 AUBIERE-cedex
FRANCE

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

Résumé

L'hévéa est un arbre qui revêt un fort intérêt économique à l'échelle mondiale. Il représente la seule source de caoutchouc naturel commercialement exploitée. La demande grandissante de cette matière première a conduit à l'initiation de nombreuses recherches visant à augmenter la production de latex.

La biosynthèse du caoutchouc à partir du saccharose se déroule dans le cytoplasme (latex) des cellules laticifères. Hétérotrophes et dépourvues de plasmodesme, les cellules laticifères disposeraient d'un équipement membranaire de transporteurs actifs spécifique, afin de répondre à leurs besoins importants en photoassimilats. Toutefois, le rôle de ces transporteurs dans la physiologie des cellules laticifères n'a jamais été élucidé. Ce travail propose la première étude moléculaire des co-transporteurs H+/ sucres solubles et H+/polyol (quebrachitol) au sein des cellules laticifères, en relation avec la production de latex.

Ce travail a permis l'identification des premiers co-transporteurs de saccharose, d'hexoses et de polyols chez l'hévéa. Dix gènes de transporteurs ont été clonés dans les cellules laticifères : 7 transporteurs putatifs de saccharose (*HbSUT1A*, *HbSUT1B*, *HbSUT2A*, *HbSUT2B*, *HbSUT2C*, *HbSUT4*, *HbSUT5*), 1 transporteur putatif d'hexoses (*HbHXT1*) et 2 transporteurs putatifs de polyols (*HbPLT1*, *HbPLT2*). Ensuite, les caractérisations physiologiques et moléculaires fines de ces transporteurs ont permis la mise en évidence du rôle potentiel et complémentaire de *HbSUT1B, HbHXT1* et *HbPLT2* dans la production de latex. *HbSUT1B* et *HbHXT1* seraient impliqués dans la régulation de la régénération du latex, alors que *HbPLT2* interviendrait dans le contrôle de l'écoulement. Ces trois gènes sont proposés en tant que marqueurs moléculaires potentiels de production.

Mots-clés : *Hevea brasiliensis*, cellules laticifères, latex, co-transporteurs H+/saccharose, co-transporteurs H+/hexoses, co-transporteurs H+/polyol, production de latex.

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

Abstract

Rubber tree is a strong interest economic worldwide tree. It is the only source of natural rubber industrially used. The extensive demand for this raw material has led to initiation of researches aiming at increasing latex production.

The rubber biosynthesis from sucrose occurs in the cytoplasm (latex) of latex cells. Heterotrophics and lacking plasmodesmata, latex cells would have a specific equipment of membrane transporters, required for their strong supply with photoassimilates. The role of these transporters in latex cells has never been elucidated. This work provides the first molecular characterization of both soluble sugar and polyol symporters within latex cells, and their relationship with the latex production.

This work led to the identification of the first putative soluble sugars and polyol transporters in rubber tree. Ten transporter genes have been cloned in latex cells: 7 putative sucrose transporters (*HbSUT1A*, *HbSUT1B*, *HbSUT2A*, *HbSUT2B*, *HbSUT2C*, *HbSUT4*, *HbSUT5*), 1 putative carrier of hexoses (*HbHXT1*) and 2 putative carriers of polyols (*HbPLT1*, *HbPLT2*). Physiological and molecular characterization of these transporters allowed us to propose the potential complementary role of *HbSUT1B*, *HbHXT1* and *HbPLT2* in latex production. *HbSUT1B* and HbHXT1 may be involved in latex regeneration, whereas *HbPLT2* may participate to the latex flow control. These three genes may serve as potential molecular markers of latex production.

Key-words : *Hevea brasiliensis*, latex cells, latex, H^+/sucrose symporters, H^+/hexoses symporters, H^+/polyols symporters, latex production.

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

Remerciements

Me voici enfin à l'heure d'écrire mon passage préféré d'une thèse… J'ai bien cru pendant un bref instant que je n'y arriverai jamais ! Et finalement, après un peu de travail (mais vraiment un peu !!!), j'y suis… mais par où commencer maintenant… Il y a tellement de personnes qui ont contribué à l'accomplissement de ce travail que je ne voudrais en oublier aucune.

Tout d'abord je tiens à remercier sincèrement Mme Marie-Pascale Prud'homme et M. Rémi Lemoine, de me faire l'honneur de juger ce travail et d'en être les rapporteurs. J'adresse également mes remerciements aux examinateurs qui ont accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Un grand merci à mon incontournable « chef », Soulaïman Sakr. Malgré deux forts caractères, peu de temps, des « prises de tête » et 451 km, nous avons réussi à réaliser un travail dont je suis fière. Merci de m'avoir choisie, de m'avoir fait confiance, et pour tout ce que tu m'auras apporté pendant ces trois ans, aussi bien au niveau scientifique que personnel.

Je tiens également à remercier Hervé Chrestin de m'avoir fait découvrir l'Hévéa, la Thaïlande et de m'avoir encadrée à si longue distance.

Et un autre grand merci à Françoise Granet, ma chef chez « bibendum » pour sa participation active, son écoute attentive, et surtout pour sa confiance. Je souhaite également remercier la MFP Michelin d'avoir financé ce travail.

En ce qui concerne les aspects techniques, je remercie la SIPH (Bongo, Côte d'Ivoire) pour l'accès au matériel végétal en plantation et la mise en place des manips de terrain.

Je voudrais aussi adresser toute ma gratitude à l'équipe de Biotechnologie et des Sciences du Végétal de l'Université de Mahidol qui m'a fourni une grande partie du matériel biologique nécessaire à cette étude, et qui m'a accueillie très chaleureusement lors de ma venue en Thaïlande.

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

Je souhaite également remercier très vivement Laurence Maurousset, Benoît Porcheron et Rémi Lemoine pour leurs énormes investissements et persévérances pour l'expression dans la levure.

Un merci tout particulier à Nicole pour tout le travail de cytologie et pour m'avoir formée à toutes ces techniques. Vive l'HIS et l'immuno !!!

Et maintenant, je m'attaque à une énorme partie... le Laboratoire PIAF ! Je pense que des mots ne suffiront pas...Tout d'abord merci à tout le PIAF, pour cette ambiance si unique et inoubliable. C'est vraiment un laboratoire hors-norme, où j'ai passé trois années exceptionnelles. Maintenant plus personnellement...

Je voudrais remercier Jean-Louis Julien de m'avoir accueillie dans son laboratoire, « recueillie » quand mon chef est parti, toujours fait rire avec ses blagues inimitables, secouée quand il le fallait, soutenue par moments aussi et surtout pour si bien représenter le Berry ; Agnès pour sa fraîcheur, sa gourmandise et sa bonne humeur sans pareils ; Nicole pour son sourire, sa patience et ses relectures si précieuses; JSV et Jérôme pour avoir fait de notre bureau un endroit « cynique » et drôle ; Sylvaine et Christelle pour leur aide et dévouement sans faille ; Nathalie pour son écoute attentive et ses précieux conseils en clonage ; Catherine pour sa jolie voix et sa tarte au maroilles ; Patricia pour avoir compati à mes problèmes de genou ; Stéphane pour avoir suivi mes conseils vestimentaires; Boris pour les soirées disco ; Aurélie pour ne m'avoir jamais refilé ses microbes ; Marie-T pour sa joie de vivre et pour m'avoir toujours simplifié les démarches administratives ; Brigitte pour avoir si bien assuré la relève; Valérie pour avoir ramené un peu d'hévéa au PIAF, m'avoir accueillie au calme dans son bureau et surtout pour avoir soutenu ce projet depuis le début; tous les thésards et stagiaires pour les moments de détente, d'entraide, de rire et les gâteaux: Wassim, Jing, Khaoula, Kessarine, Hosam, Clémence, Astrid, Caroline, Céline, Thomas, David, Vincent, Rémy ; tous les membres du PIAF-INRA notamment Norbert pour ses nombreux dépannages, André pour les stats, Bruno pour son écoute et Thierry pour sa confiance...

Enfin je souhaite exprimer toute mon affection et ma gratitude à trois personnes particulières : Delphine, ma copine ! parce qu'on aime les fringues, les bijoux, les piercings, se moquer, être méchantes et surtout être ensemble. Ludo parce qu'on a partagé bien plus

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

qu'un bureau, qu'il m'a accordé sa confiance et que c'est mon petit Auvergnat préféré. Et Johann parce qu'il a promu au rang de thésarde cinq étoiles (et aussi parce qu'il est le roi de la biblio^ ^)... Merci sincèrement à tous les trois, vous avez embelli ces trois années, Merci d'être mes amis...

J'adresse également un grand merci à mes meilleurs amis LyLy, Fred alias Salamèche et CB241 (mon premier chef) qui ont toujours été là, dans les bons comme dans les mauvais moments. Vous êtes tellement importants pour moi....

Merci aussi à Mark Zuckerberg, créateur de Facebook®, et M. Ferrero, inventeur du Nutella®, qui ont fortement contribué à ma survie.

Ensuite je voudrais remercier mon extraordinaire famille, tout simplement parce que sans chacun d'eux je ne serais pas là aujourd'hui. Alors merci Maman (MPTEODTLCMCDVOMEC), Papa (mon papounet de toujours), Lucas (le meilleur guitariste de l'univers en toute objectivité), Clem (ma petit sœur préférée qui déploie ses ailes) et Lala (la grand-mère la plus cool du monde qui est inscrite sur Facebook et msn).
Une tendre pensée pour Marguerite....
Merci aussi à Solange et Daniel, entre autres pour leurs nombreux dépannages au pied levé.

Enfin, merci aux deux hommes de ma vie David et Esteban sans qui rien n'aurait été possible...

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

Sommaire

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

Contexte.....1

Synthèse bibliographique.....2

CHAPITRE 1 : *hevea brasiliensis*.....2

1. L'HEVEA : HISTOIRE ET IMPORTANCE SOCIO-ECONOMIQUE.....3

1.1. Domestication.....3

1.2. L'Hévéa en quelques chiffres.....4

2. HEVEACULTURE ET EXPLOITATION.....4

2.1. Les Produits de l'Hévéaculture.....4
2.1.1. Le caoutchouc.....4
2.1.1.1. Propriétés physico-chimiques.....5
2.1.1.2. Domaines d'utilisation.....5
2.1.1.3. Une demande grandissante.....6
2.1.2. Le bois.....6

2.2. Culture de clones de greffe.....7
2.2.1. Origine des clones.....7
2.2.2. Technique du greffage.....7

2.3. Modes de conduite de l'exploitation.....8
2.3.1. La saignée.....8
2.3.1.1. La récolte du latex.....8
2.3.1.2. Conduite de l'exploitation du panneau de saignée.....9
2.3.2. La stimulation de la production.....10
2.3.2.1. Stimulation éthylénique.....10
2.3.2.2. Stimulation par d'autres molécules.....10
2.3.3. Le Diagnostic Latex : aide à la conduite d'exploitation.....10

2.4. Les principaux clones commerciaux :.....12

3. LES CELLULES LATICIFERES : UN MODELE UNIQUE.....13

3.1. Physiologie.....13

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

3.2. Le latex....14
3.2.1. La biosynthèse du caoutchouc....14
3.2.1.1. La Glycolyse....15
3.2.1.2. La biosynthèse isoprénique....15
3.2.1.2.1.La synthèse de l'Acétyl-CoA....16
3.2.1.2.2.La voie du MVA....16
3.2.1.2.3.La voie du MEP....17
3.2.1.3. Régulation de la biosynthèse du caoutchouc....17
3.2.2. Import des assimilats....19
3.2.3. Effet physiologique de la stimulation ethylénique....20

CHAPITRE 2 : les sucres et leurs transporteurs....21

1. LES SUCRES CHEZ LES VEGETAUX....22

1.1. Identification....22
1.1.1. Origine photosynthétique....22
1.1.2. Sucres de réserve....22

1.2. Rôles....23

1.3. Transport....23

2. LES TRANSPORTEURS DE SUCRES....24

2.1. Identification....25
2.1.1. Les transporteurs de saccharose....25
2.1.1.1. clonage....25
2.1.1.2. Caractéristiques....26
2.1.2. Les transporteurs d'hexoses....28
2.1.2.1. Clonage....28
2.1.2.2. Caractéristiques....29

2.2. Expression et localisation....30
2.2.1. Expression....30
2.2.2. Localisation....30

2.3. Fonctions....31

2.4. Régulation....32
2.4.1. Transcriptionnelle et post-transcriptionnelle....32
2.4.1.1. Les promoteurs....32
2.4.1.2. Régulation au cours du développement....33

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

2.4.1.3. Régulation par les facteurs environnementaux 34
2.4.1.4. Régulation hormonale 35
2.4.2. Modifications post-traductionnelles 35
2.4.2.1. Phosphorylation 35
2.4.2.2. Autres modifications post-traductionnelles 36

CHAPITRE 3 : les polyols et leurs transporteurs 37

1. LES POLYOLS CHEZ LES VEGETAUX 38

1.1. Identification 38

1.2. Rôles 39
1.2.1. Les polyols aliphatiques 39
1.2.2. Les polyols cycliques 40
1.2.3. Le Quebrachitol 41

1.3. Transport 41

2. LES TRANSPORTEURS DE POLYOLS 43

2.1. Identification 43
2.1.1. Les transporteurs de polyols aliphatiques 43
2.1.1.1. Clonage 43
2.1.1.2. Caractéristiques 44
2.1.2. Les transporteurs de polyols cycliques 45
2.1.2.1. Clonage 45
2.1.2.2. Caractéristiques 46
2.1.2.2.1. *Mitr1* et *Mitr2* 46
2.1.2.2.2. *AtINT4* et *AtINT2* 47
2.1.3. Les transporteurs type « *AtPLT5* » 48
2.1.3.1. Clonage 48
2.1.3.2. Caractéristiques 48

2.2. Localisation, Expression 49

2.3. Rôles 49

2.4. Régulation 50

Objectifs 51

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

Résultats……52

CHAPITRE 1……52

Les Transporteurs de sucres des cellules laticifères et leur rôle dans la production de latex

ARTICLE 1 : "Sucrose importation into laticifers of Hevea brasiliensis, in relation to ethylene stimulation of latex production"……...…….....55

ARTICLE 2: "*HbSUT1B* and *HbHXT1*: potential role of two sugar transporters in ethylene-stimulated latex production in exploited rubber tree"……..…….....64

ARTICLE 3: "Molecular characterization of the sucrose transporter HbSUT1B in relation to rubber production in latex cells"…….....81

Conclusions……90

CHAPITRE 2……91

Les Transporteurs de polyols des cellules laticifères et leur rôle dans la production de latex

ARTICLE 4: "Cloning and characterization of a new polyol transporter (HbPLT2) in *Hevea brasiliensis"*……..……...……..94

Résultats complémentaires……110

Conclusions……114

Discussion générale & Perspectives……115

Références Bibliographiques……128

Annexes……155

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

Abréviations

ABA : Acide abscissique

AcetylCoA: Acetyl Coenzyme A

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire

ADP : Adénosine diphosphate

AP : Aquaporine

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : Acide ribonucléique messager

ATP : Adénosine 5'-triphosphate

Aux : Auxine

bp : paires de bases

C : Carbone

CPA : acide 2-3 chlorophénoxy propionique

DEPC : Diéthylpyrocarbonate

DHAP : Dihydroxyacetone phosphate

DL : Diagnostic latex

F6P : Fructose-6-Phosphate

G1P : Glucose-1-Phosphate

G6P : Glucose-6-Phosphate

HIS : hybridation *in situ*

HUP : Hexose uptake protein

HXTs : HeXose transporters

IP : Invertase pariétale

JA : Acide jasmonique

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

kDa : Kilodalton

LD : Latex diagnosis

NADH : nicotinamide adénine dinucléotide

NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

ORF : Open reading frame

PCMBS : *p*-chloromercuriphenylsulfonic acid

PCR : Polymerase chain reaction

PEP : Phosphoenolpyruvate

PEPCase : Phosphoenolpyruvate carboxylase

Pi : Phosphate inorganique

pI : Point isoélectrique

PLTs : Polyol transporter

PPI (IDP) : Pyrophosphate d'isopenténylе (Isopenténylе Di-Phosphate)

Qr : Quantité relative

QTLs : quantitative trait locus

RT : Reverse transcription

SA : Acide salicylique

SALB : Southern american leaf blight

SDS : Sodium dodécyl sulfate

STP : sugar transporter

SUC : Sucrose carrier

SUTs : Sucrose transporters

Trioses-P : Trioses phosphate

UDPG : Uridine di-phosphate-glucose

UTP : Uridine tri-phosphate

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

MEMENTO

- **Cellules laticifères** : cellules hautement spécialisées de l'écorce interne qui produisent du caoutchouc naturel
- **Latex** : cytoplasme des cellules laticifères
- **Ethylène** : hormone utilisée pour stimuler la production de latex au champ
- **PB217** : clone d'hévéa dont les caractéristiques sont :
  - Activité métabolique moyenne
  - Concentration en saccharose du latex élevée
  - Faible production
  - Production fortement stimulée par l'éthylène
- **PB260** : clone d'hévéa dont les caractéristiques sont :
  - Activité métabolique élevée
  - Concentration en saccharose du latex faible
  - Forte production
  - Production faiblement stimulée par l'éthylène
- **SUTs** : co-transporteurs membranaire H^+/saccharose
- **HXTs** : co-transporteurs membranaire H^+/hexoses
- **PLTs** : co-transporteurs membranaire H^+/polyols

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

Contexte

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

L'hévéa est un arbre aux produits dérivés à haute valeur ajoutée. Il représente la base de toute une économie, vitale pour certaines régions du globe (Asie). L'hévéa est la seule source commercialement exploitée du caoutchouc naturel, indispensable dans l'industrie pneumatique mais aussi dans la vie quotidienne. Pour plusieurs raisons combinées (développement des pays, augmentation du prix du caoutchouc synthétique…), la demande en caoutchouc naturel ne cesse d'augmenter depuis les quinze dernières années. Celle-ci a pratiquement doublé depuis 1994 et une extrapolation de l'évolution de cette demande prévoit une consommation de 16 millions de tonnes environ par an en 2020 ; aujourd'hui la production mondiale est de seulement 10 millions de tonnes annuels. Par conséquent, il est possible que prochainement la consommation dépasse la production et que le caoutchouc naturel devienne une matière première limitante. Pour cette raison, actuellement de nombreuses études visant à augmenter la production sont initiées. C'est dans ce cadre que s'inscrit notre projet d'étude.

Pour augmenter la production de caoutchouc naturel, deux stratégies sont envisagées. La première consiste à étendre les zones d'exploitation de l'hévéa à des zones non traditionnelles de culture. La seconde méthode consiste à augmenter le rendement de la production, qui dépend de deux paramètres : i) la durée de l'écoulement du latex. En effet, si le latex est fluidifié, son écoulement est facilité et prolongé et le rendement en est alors augmenté ; ii) l'activité du métabolisme carboné laticifère aboutissant à la biosynthèse du caoutchouc. C'est dans ce contexte précis que s'inscrit la problématique de ce travail de thèse. Le saccharose étant le précurseur de la biosynthèse du caoutchouc et le sucre le plus abondant du latex, sa concentration dans les cellules laticifères et *a fortiori* son influx dans ces cellules, sont des facteurs limitants pour la production. L'objectif principal de notre étude est donc d'identifier les transporteurs de sucres des cellules laticifères, et d'évaluer leur rôle potentiel dans la production de latex.

Afin d'obtenir les éléments de compréhension nécessaires à l'établissement de notre raisonnement scientifique, une synthèse bibliographique complète va être tout d'abord presentée. Celle-ci reprendra logiquement les principales connaissances sur l'hévéa, les transporteurs de sucres et de polyols.

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

Synthèse bibliographique

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

Chapitre 1 :

Hevea brasiliensis

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

Figure 1 : Photo d'une plantation d'*Hevea brasiliensis*

Photo prise en Thaïlande en novembre 2007

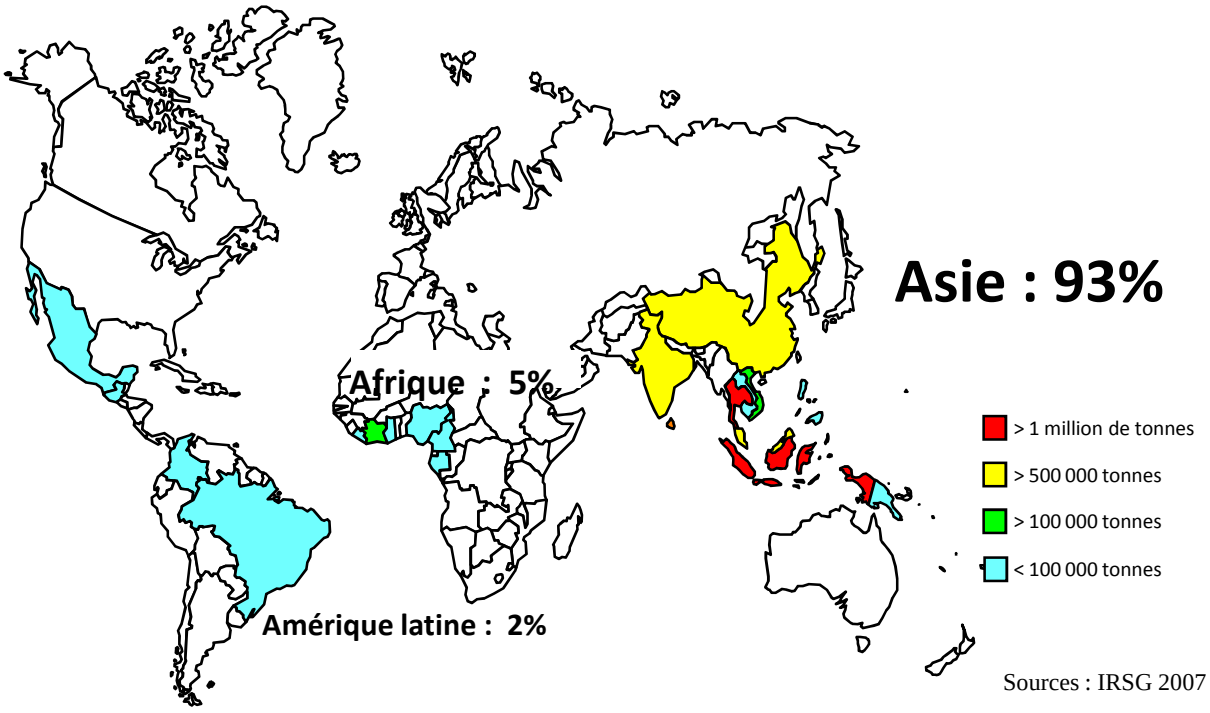


Figure 2 : Répartition des principales exploitations d'hévéas dans le monde et leur production de caoutchouc (tonnes/an)

1. L'Hévéa : histoire et importance socio-économique

1.1. Domestication

Hevea brasiliensis (figure 1), ou arbre à caoutchouc, est un arbre de la famille des Euphorbiacées (Ordre des Malpighiales), qui regroupe des espèces herbacées et ligneuses caractérisées par la présence abondante de latex dans le phloème de leurs tiges et feuilles. Parmi tous les représentants (6 000 espèces), nous retrouvons notamment le ricin (*Ricinus communis*) et le manioc (*Manihot esculenta*). Les Euphorbiacées sont réparties dans les zones tempérées et tropicales.

Hevea brasiliensis est originaire, comme l'indique son nom, du bassin amazonien et plus particulièrement du Brésil (Mato Grosso, Para). C'est au début du XIXème siècle que l'explosion de l'usage du caoutchouc va provoquer l'intensification de l'exploitation des hévéas sauvages en Amérique Latine. Puis en 1876, l'anglais Henri Wikcham collecte des graines au Brésil et les envoie au jardin botanique de Kew en Angleterre. En 1877, 22 plants provenant de la collection Wikcham sont envoyés au jardin botanique de Singapour. La forte augmentation des prix du caoutchouc amazonien va conduire l'Angleterre et la Hollande à développer l'hévéaculture dans leurs colonies asiatiques, entrainant ainsi la ruine de l'économie de cueillette des hévéas en Amazonie.

En 1900, le champignon *Microcyclus ulei*, responsable d'une maladie ravageuse des feuilles (SALB pour South American Leaf Blight) fait son apparition sur des hévéas sauvages au Brésil. Ce champignon pathogène biotrophe s'est ensuite rapidement propagé des hévéas sauvages aux plantations. La maladie, provoquant un arrêt de la production de latex, a empêché tout développement d'une hévéaculture rentable en Amérique du Sud. Bien que *Mycrocyclus ulei* soit toujours absent des continents asiatique et africain, une grande menace pèse sur l'hévéaculture mondiale, car les clones cultivés dans ces deux continents sont très sensibles au SALB (clones Wikcham).

Toutes ces raisons font qu'aujourd'hui l'hévéa est largement implanté dans les régions tropicales mondiales et que les zones majoritaires de plantations se situent hors du berceau d'origine de « l'arbre qui pleure » (figure 2).

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

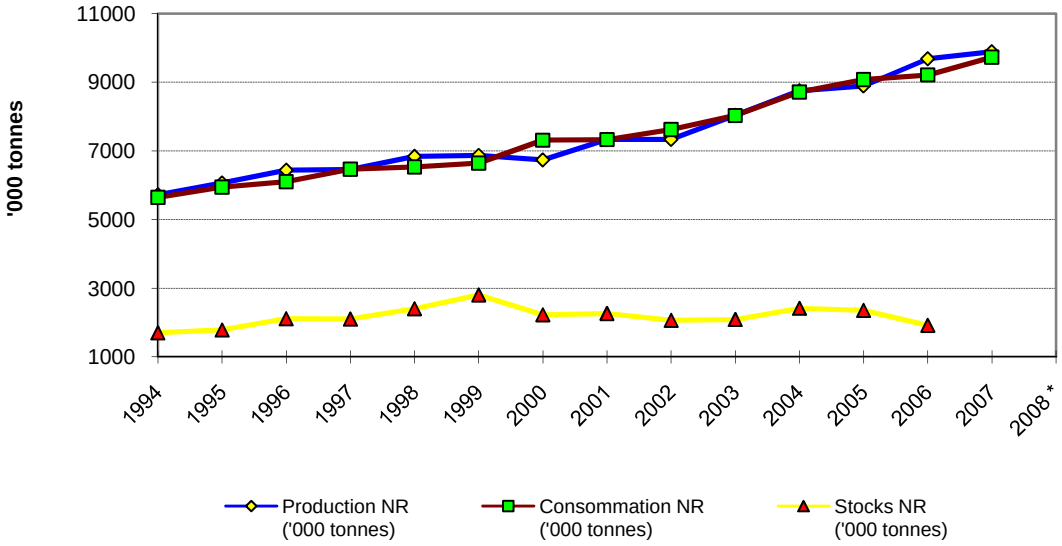


Figure 3 : Evolution de la production, de la consommation et de la réserve de caoutchouc naturel mondiales (NR)

La production, la consommation et la réserve de caoutchouc naturel mondiales sont représentées en milliers de tonnes annuels en fonction de l'année.
(Données IRSG)

1.2. L'Hévéa en quelques chiffres

L'hévéaculture est aujourd'hui très développée dans le monde car elle représente la seule source de caoutchouc naturel commercialement exploitée. De ce fait, cette culture revêt un fort impact socio-économique mondial.

La majorité de la production mondiale de caoutchouc est actuellement assurée par le continent asiatique : celui-ci détient 93 % de la production totale. Le reste de la production est assuré par l'Afrique pour 5 % et l'Amérique latine pour 2 % (figure 2). Au total, ce sont 10 millions de tonnes de caoutchouc produites par an (données 2007 IRSG). La consommation mondiale annuelle de caoutchouc de 9,7 millions de tonnes, est quasiment équilibrée à la production (figure 3).

L'hévéaculture représente 10,3 millions d'hectares sur la surface de la planète. Les pourcentages des aires de répartitions sont identiques à ceux de la production mondiale, avec une forte concentration des plantations en Asie (Thaïlande, Malaisie, Cambodge…).

D'un point de vu social, l'hévéa joue également un rôle très important. En effet, l'hévéaculture génère de nombreux emplois notamment dans les pays en voie de développement (Asie, Afrique) et est parfois même, à la base de la vie de toute une région. Par exemple, en Asie, 30 millions d'habitants vivent de cette culture, soit environ 1% de la population totale. De plus les plantations en zones généralement isolées, permettent le maintien des populations locales en milieu rural et leur assurent un accès à la formation, la scolarité et la santé.

(Données chiffrées fournies par la Manufacture Française des Pneumatiques Michelin, la Société Internationale de Plantations d'Hévéas -SIPH- et l'International Rubber Study Group -IRSG- ; données 2007).

2. Hévéaculture et Exploitation

2.1. Les Produits de l'Hévéaculture

2.1.1. Le caoutchouc

Le produit d'intérêt économique à forte valeur ajoutée issu de l'hévéaculture est le caoutchouc naturel. Il s'agit d'un polymère naturel, issu du métabolisme secondaire. C'est un élastomère, c'est-à-dire qu'il retrouve sa forme après avoir été étiré ou déformé (propriétés élastiques). Le caoutchouc naturel ou polyisoprène est un polymère diène (hydrocarbure

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

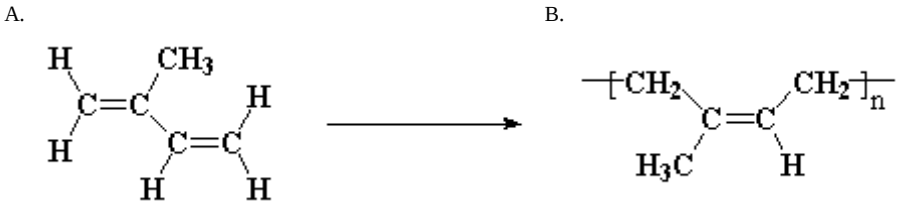


Figure 4 : Formules chimiques développées de l'isoprène et du polyisoprène

Le caoutchouc naturel est un isomère élastique appelé polyisoprène. Sa formule chimique développée (B) ainsi que celle du monomère qui le compose (A) sont ici représentées.

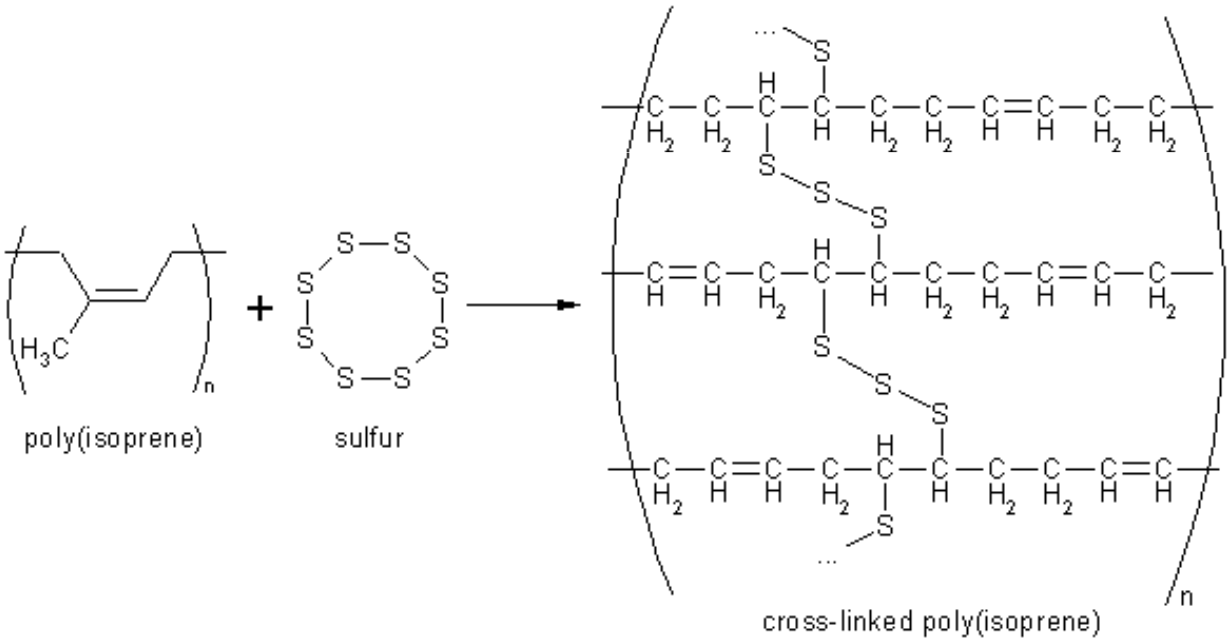


Figure 5 : Réaction de vulcanisation du caoutchouc

La vulcanisation est un procédé qui permet la stabilisation du caoutchouc naturel et de ses propriétés. Elle consiste à chauffer le caoutchouc en présence de soufre (dosage très précis). Des liaisons électroniques sont alors créées entre les monomères de caoutchouc et le soufre, ce qui permet le pontage de deux polymères.

contenant deux doubles liaisons), synthétisé à partir d'un monomère, l'isoprène (C_5H_8) contenant deux doubles liaisons carbone-carbone (figure 4).

2.1.1.1. Propriétés physico-chimiques

Le caoutchouc naturel est réputé pour ses propriétés physico-chimiques remarquables. En effet, il est collant, rebondissant, étirable à volonté, flexible et très résistant. Cependant, ses propriétés dépendent très fortement de la température ambiante. Il est cassant entre 0 et 10°C, devient mou et élastique à plus de 20°C, enfin à plus de 50°C le caoutchouc est plastique et collant. C'est à cause de cette instabilité que son utilisation industrielle à grande échelle a été tardive. Il a fallu attendre 1840 pour que Charles Goodyear découvre la vulcanisation qui permet d'assurer la cohésion du caoutchouc et de stopper le phénomène de fonte. Il s'agit d'un procédé de chauffage du caoutchouc en présence de soufre. Des liaisons électroniques sont alors établies entre le soufre et les monomères du caoutchouc, ce qui permet la connexion de deux polymères (figure 5). Le caoutchouc est alors moins plastique mais plus élastique. Un des éléments essentiels de ce procédé de pontage est le dosage du soufre.

2.1.1.2. Domaines d'utilisation

Même si le caoutchouc synthétique a menacé son exploitation, le caoutchouc naturel reste indispensable. En effet, il possède des qualités que le caoutchouc synthétique, fabriqué à partir du pétrole, ne parvient pas à égaler. Il est donc indispensable dans de très nombreux domaines industriels.

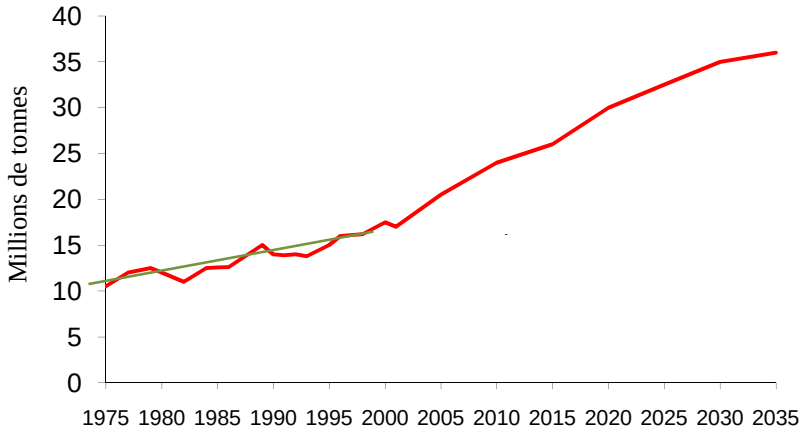
Le secteur principal d'utilisation du caoutchouc naturel est la pneumatique. Il représente 90 % de la production mondiale (10 millions de tonnes par an, données OMC 2006). Les plus gros consommateurs étant les domaines des poids lourds et de l'aviation. Ici le caoutchouc naturel est utilisé mélangé à de nombreux autres matériaux, comme notamment le noir de carbone (matériau carboné colloïdal) qui améliore la résistance mécanique et la résistance à l'abrasion du produit fini.

Le caoutchouc naturel est aussi employé dans les domaines de la vie quotidienne. Par exemple le matériel médical nécessite beaucoup de cette matière première (gants, tubulure, seringue…). Le caoutchouc naturel est utilisé pour la fabrication des chaussures, des tétines, des lunettes, des préservatifs…

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

A.



B.

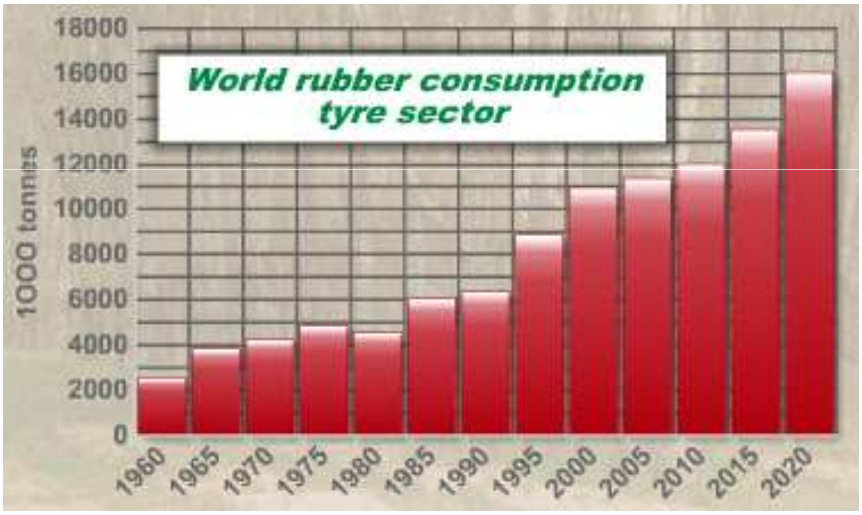


Figure 6 : Extrapolation de la consommation mondiale de caoutchouc

(A) Une étude a pu mettre en évidence l'augmentation de la consommation mondiale tous secteurs confondus de caoutchouc naturel. Une extrapolation de cette consommation a été réalisé et est représentée ici, d'après Budiman (2005).

(B) Une extrapolation de la consommation actuelle de caoutchouc naturel par le secteur de la peummatique a également été réalisé, d'après SIPH. (http://www.siph.com/)

2.1.1.3. Une demande grandissante

La consommation mondiale de caoutchouc naturel a connu une hausse importante au cours des 30 dernières années. Elle est passée de 6 millions de tonnes en 1995, à 7,3 millions de tonnes en 2000 puis 9,7 millions de tonnes en 2007. Des analyses prospectives indiquent une progression stable de cette consommation avec une demande de 16 millions de tonnes par an en 2020 (données IRSG, figure 6). Plusieurs explications à ce phénomène ont été proposées :

En premier lieu, la consommation en caoutchouc naturel est dépendante du niveau de vie des pays. Nous assistons ainsi à un déplacement progressif de la demande de l'Europe vers l'Asie, qui assure au caoutchouc naturel des débouchés à la mesure des perspectives de développement à moyen terme de cette région du globe (Chine, Inde, Indonésie, Thaïlande et Vietnam notamment) malgré la crise actuelle.

En deuxième lieu, le caoutchouc naturel résiste très bien à la concurrence du caoutchouc synthétique. Sa part dans la consommation totale n'a cessé de progresser au cours des dernières années (35 % en 1990, 39 % en 1995, 49 % en 2007) sous l'effet d'une double évolution : le développement des pneus à carcasse radiale fabriqués avec une proportion plus importante de caoutchouc naturel et la montée en puissance d'une industrie de manufacture dans les pays producteurs de caoutchouc naturel. Simultanément, l'augmentation du prix du pétrole et de ses dérivés, a également provoqué la diminution de l'utilisation du caoutchouc synthétique.

Enfin, contrairement à la pétrochimie, l'hévéaculture répond aux contraintes du développement durable :

i) Critères économiques : contributeur de richesses, participation à des projets de développement durable.
ii) Critères sociaux : maintien des populations locales, accès à la formation, à la scolarité et à la santé.
iii) Critères environnementaux : lutte contre la déforestation et l'érosion des sols, adéquation parfaite au protocole de Kyoto (économie des ressources fossiles et de l'énergie, fixation du CO_2) et processus de production peu polluant.

2.1.2. Le bois

Après environ une trentaine d'année, le rendement en latex d'une plantation d'hévéa n'est plus rentable. La plantation est alors abattue et replantée. Le bois ainsi récupéré est très

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

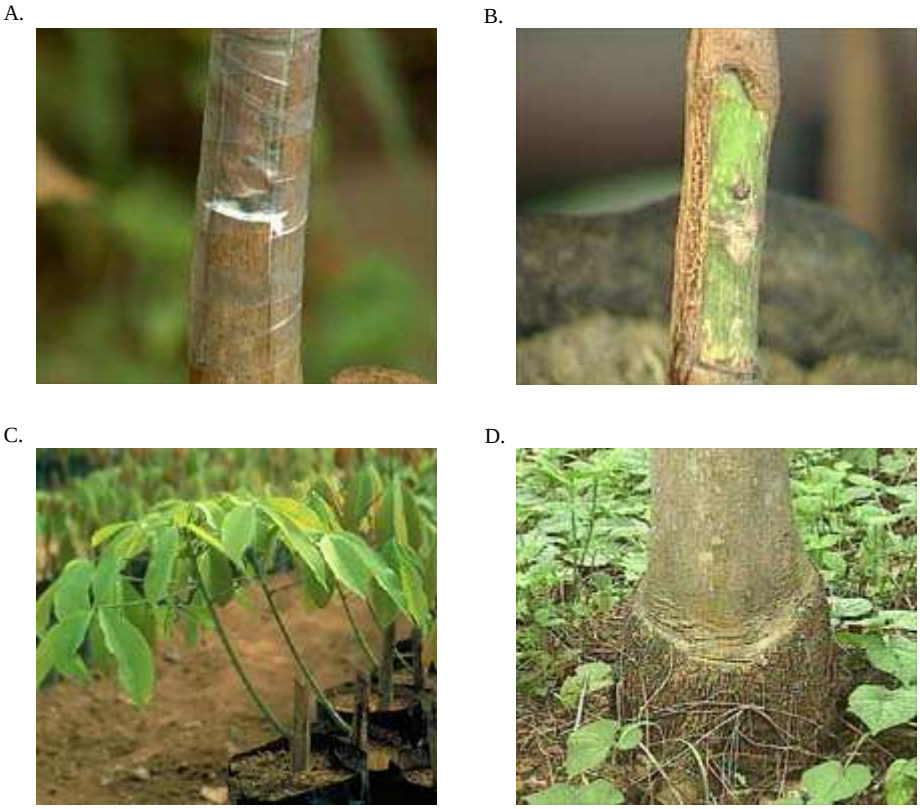


Figure 7 : Greffage chez l'hévéa

Sur ces photos sont représentées les principales étapes décisives de la technique de greffe chez l'hévéa.

(A) Photo de l'emmaillotage : le fragment de tissu du clone d'élite est précisément inséré sous l'écorce découpée du porte-greffe. Puis celle-ci est rabattue et les deux éléments sont maintenus ensembles grâce à un film plastique très serré.

(B) Premiers signes de réussite de la greffe. Lors du démaillotage, le fragment du clone d'élite est vert et vivant.

(C) Le sevrage : le porte-greffe est étêté et les feuilles du greffon remplace celle du porte-greffe.

(D) Le bourrelet de greffe : le plant greffé garde toujours la cicatrice de la greffe dont il est issu

valorisable. Ses principales qualités sont une couleur claire (permet toutes les finitions et teintes), une grande stabilité et un façonnage facile. Désormais, le bois d'hévéa est très populaire pour la fabrication d'escaliers, de meubles, de dessus de tables et d'objets en bois massif. A titre d'exemple, 80% des meubles exportés par la Thaïlande et la Malaisie sont fabriqués à partir du bois des plantations d'hévéa.

2.2. Culture de clones de greffe

2.2.1. Origine des clones

Aujourd'hui, les variétés cultivées sont essentiellement des clones de greffes. Des génotypes élites préalablement sélectionnés pour leurs qualités agronomiques (résistance à des maladies, à des stress, à des climats contraignants, production importante…) ont été multipliés par greffage de bourgeons sur des porte-greffes. Ils sont conservés dans des jardins à bois qui servent à la production de nouveaux greffons, pour l'implantation de nouvelles plantations. Ainsi, tous les arbres d'une plantation sont des clones génétiquement identiques au niveau des parties aériennes (tronc et couronne). Seuls le pied et le système racinaire (porte-greffe) sont génétiquement hétérogènes.

2.2.2. Technique du greffage

Les porte-greffes sont produits en pépinières et les producteurs de greffons en parcs à bois. Ces derniers sont poussés, par tailles successives, à produire des tiges porteuses de bourgeons axillaires qui serviront de greffons. Une fenêtre est découpée au pied du porte-greffe. L'écorce est découpée et décollée, et le greffon est glissé dans l'entrebâillement. Les tissus vivants qui vont se souder doivent être parfaitement ajustés. Ensuite, "l'emmaillotage" ou "ligature" est effectué à l'aide d'une bande plastique (figure 7A). Une greffe est considérée comme réussie lorsque, au moment du démaillotage (2 à 3 semaines après la greffe), les tissus du greffon sont encore verts (figure 7B).

Démailloté, le bourgeon greffé débourre. Le greffon croît, se développe sur le porte-greffe et son feuillage finit par remplacer celui du porte-greffe. Enfin, vient l'étape de sevrage qui consiste à étêter le porte-greffe. Le greffon va se redresser, la partie du porte-greffe qui le surplombe va mourir et disparaître et, peu à peu, le greffon prolongera le porte-greffe (figure 7C). Le plant greffé gardera toujours la cicatrice de la greffe dont il est issu (figure 7D).

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

Figure 8 : La récolte du latex

Après la saignée, le latex s'écoule le long de l'encoche et est récolté dans un récipient : la tasse

Figure 9 : Récolte du latex résiduel ou fonds de tasse

Après chaque récolte du latex liquide, du latex résiduel reste au fond de la tasse et coagule. Ce dernier fait l'objet d'une récolte particulière

2.3. Modes de conduite de l'exploitation

2.3.1. La saignée

La saignée est l'opération qui consiste à pratiquer une incision de l'écorce de l'arbre. La section des manteaux laticifères, organisés en réseau paracirculatoire (Jacob *et al.*, 1995a) provoque l'écoulement du latex, expulsé par la pression de turgescence s'exerçant *in situ*. Ce mode de récolte est particulièrement adapté à l'organisation des cellules laticifères, en manteaux concentriques indépendants.

2.3.1.1. La récolte du latex

Le latex drainé dans l'écorce s'écoule en suivant l'encoche pendant quelques heures. Puis l'encoche se bouche par coagulation du latex et l'écoulement s'arrête. Le latex est récupéré par une gouttière qui permet son écoulement dans un récipient : la tasse (figure 8). La récolte peut se faire sous forme liquide juste après la saignée, on parle alors de récolte en latex ; ou sous forme solide si on laisse le latex coaguler dans la tasse (récolte en coagulum).

- Récolte de latex liquide :

Pour empêcher la coagulation précoce, quelques gouttes d'ammoniaque sont ajoutées au latex. Le latex liquide est ensuite filtré et rassemblé dans des conteneurs. Il est ensuite passé dans des centrifugeuses qui éliminent une partie de l'eau et amènent la concentration du caoutchouc entre 61 et 63 %. Des stabilisants chimiques sont ajoutés pour assurer sa conservation.

Après chaque récolte, du latex résiduel subsiste au fond de la tasse et coagule. Avant la saignée suivante, la tasse est nettoyée de ce résidu. Le latex coagulé ainsi récupéré est appelé "fond de tasse". Le fond de tasse se détache aisément et peut être accroché à un dispositif particulier pour faire, par la suite, l'objet d'une récolte spécifique (figure 9). Les fonds de tasse récoltés sont rassemblés. Ce produit peut constituer jusqu'à 25 % de la récolte et est traité à part.

- Récolte de coagulum :

Le processus de transformation post-récolte démarre par l'ajout d'un peu d'acide (formique en général) pour faire coaguler le latex. Les coagula sont lavés et déchiquetés, puis réassemblés sous deux formes selon la technique de séchage employée. Soit ils sont fumés ou séchés à l'air chaud (120°C) pour obtenir des feuilles ; soit ils sont compactés puis séchés pour obtenir

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

Figure 10 : La saignée de l'hévéa

La saignée est l'action de blessure de l'écorce de l'hévéa qui permet la section des manteaux laticifères et donc l'expulsion du latex.

Figure 11 : Le couteau de saignée

Photo de l'outil qui sert à rouvrir l'encoche à chaque saignée. Il permet d'entailler l'écorce jusqu'au cambium sans blesser ce dernier.

des balles (33 kg). Les balles et feuilles seront passées dans une sorte de laminoir appelé « cylindres » ou « mélangeur ouvert ».

2.3.1.2. Conduite de l'exploitation du panneau de saignée

Par le passé, de nombreuses configurations ont été données aux encoches de saignées (Gomez, 1983). Cependant, au début du XXème siècle, une méthode rationnelle d'exploitation à été mise en place par Ridley (Sérier, 1993). Ce mode d'exploitation, encore utilisé aujourd'hui, consiste à rouvrir une même encoche à chaque saignée (figure 10). Les saigneurs éliminent une fine couche d'écorce (au maximum 2 mm) à l'aide d'un couteau de saignée (figure 11). Il s'agit d'une opération très délicate nécessitant une grande expérience et de la dextérité car il ne faut pas léser le cambium, lequel permet la régénération des tissus. Si le cambium est atteint lors de la saignée, cela provoque des blessures irréversibles qui peuvent même provoquer l'arrêt de la production de latex si elles sont excessives.

Dans la grande majorité des plantations hévéicoles, la saignée se fait en demi-spirale descendante durant les premières années d'exploitation. Le tronc de l'arbre est alors partagé longitudinalement suivant deux demi-circonférences : les panneaux de saignée. Lorsque toute l'écorce du premier côté exploité a été consommée (après environ 6 ans d'exploitation), le panneau suivant est entamé, également en saignée descendante. Lorsque toute l'écorce basse a été utilisée, on peut pratiquer la saignée inversée (ou remontante). Cette dernière, bien que délicate, est très productive. Elle se pratique en quarts de spirales et peut durer ainsi au moins 8 ans. Il est alors possible de recommencer la saignée basse sur l'écorce préalablement saignée qui se sera entre-temps régénérée. Au total, un arbre pourra être exploité une trentaine d'années.

La fréquence de saignée a également évolué. Afin d'augmenter la productivité et donc de baisser les coûts d'exploitation, une réduction progressive des fréquences de saignée a été mise en place. De la saignée tous les jours ou tous les deux jours (d/2), la fréquence a été réduite à tous les 4, 5 ou 6 jours (d/4, d/5, d/6).

Il est très important de noter que la réduction de la fréquence de saignée et l'adaptation de la longueur d'encoche a été rendue possible par la mise en œuvre de la stimulation de la production.

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

Figure 12 : La Stimulation éthylénique sous forme liquide (Ethrel®)

La production de latex peut être stimulée par l'application au pinceau sur l'écorce d'un libérateur d'éthylène *in situ* : l'Ethrel.

(A) Application au pinceau du produit stimulant

(B) Etat de l'encoche de saignée après traitement. Le produit est coloré pour avoir un repère visuel du traitement.

Figure 13 : La Stimulation éthylénique sous forme gazeuse

La production de latex peut être stimulée par injection directe sous l'écorce externe d'éthylène gazeux. Le système utilisé ici est appelé RRIMFLOW.

2.3.2. La stimulation de la production

2.3.2.1. Stimulation éthylénique

La stimulation a pour but d'améliorer la production afin de rendre celle-ci suffisante et rentable sans surexploiter les arbres. Elle se fait notamment *via* une prolongation de l'écoulement du latex (Campaignolle et Bouthillon, 1955 ; Pakianathan , 1976 ; Primot, 1977a ; Premakumari *et al.*, 1980 ; Eschbach et Banchi, 1985). Cette pratique s'est considérablement développée après la découverte de l'éthéphon et de son important pouvoir stimulant (Abraham *et al.*, 1968 ; d'Auzac et Ribaillier, 1969). L'éthéphon, ou acide chloro-2-éthylphosphonique, est un régulateur de croissance libérant de l'éthylène *in situ.*
Le produit est généralement appliqué au pinceau en mélange avec de l'huile de palme pour la forme liquide (Ethrel®) sur l'encoche de saignée (figure 12). Une autre méthode utilise de l'éthylène sous forme gazeuse, directement injecté dans l'écorce (figure 13). Cette application se réalise de préférence le lendemain d'une saignée et 48 heures avant la saignée suivante. Entre deux stimulations, un délai est respecté afin de laisser à l'arbre le temps de rétablir son équilibre physiologique. L'effet de la stimulation perdure pendant 4 ou 5 saignées et la fréquence de l'opération de stimulation doit être prudemment limitée (Gohet, 1996).

2.3.2.2. Stimulation par d'autres molécules

Préalablement à l'ethylène (ou à ses générateurs) d'autres molécules ont été testées pour leur pouvoir stimulant, comme par exemple le sulfate de cuivre, l'acide borique, le 2,4-D et le peroxyde d'hydrogène (d'Auzac, 1989b). Cependant, leur toxicité pour les tissus de l'écorce (de Faÿ, 1984) a conduit à leur abandon définitif.

2.3.3. Le Diagnostic Latex : aide à la conduite d'exploitation

Il existe un test biochimique : le Diagnostic Latex (DL) qui permet de statuer sur l'état physiologique de l'arbre en exploitation (Jacob *et al.*, 1985). Il s'agit d'un test qui prend en compte divers paramètres détaillés ci-après et qui donne une représentation fidèle de l'état de fonctionnement métabolique du système laticifère à un instant *t*. Il est ainsi possible de déterminer le statut physiologique d'arbres soumis à ce système d'exploitation. Les paramètres pris en compte pour le DL ont été sélectionnés en réponse à deux critères : 1) leur implication directe ou indirecte dans les mécanismes biochimiques de l'écoulement ou de la

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

régénération ; 2) leur mesure simple et fiable. Dans un premier temps, les huit paramètres suivant ont été retenus : le pH cytosolique, l'extrait sec, la concentration en saccharose, le phosphate inorganique, les thiols, le magnésium, l'indice d'éclatement des lutoïdes et le potentiel d'oxydo-réduction. Dans la pratique la détermination de l'ensemble de ces paramètres s'avère relativement lourde et coûteuse. Par conséquent, seuls quatre ont été conservés pour décrire l'état global de fonctionnement métabolique du réseau laticifère (Jacob *et al*., 1988 ; Jacob *et al.*, 1995c).

- L'extrait sec :

Il prend en compte tous les constituants non aqueux des cellules laticifères et reflète l'activité biosynthétique globale. Il fournit également un indice sur les caractéristiques d'écoulement (Lacrotte, 1991). La valeur de l'extrait sec est proportionnelle à l'activité métabolique : plus le métabolisme de régénération sera efficient, plus la valeur de l'extrait sec sera élevée. Cependant si la valeur est trop élevée, celle-ci peut être le signe d'un mauvais rééquilibrage hydrique et d'un mauvais écoulement dû à une grande viscosité du latex.

- La concentration en saccharose :

Le saccharose étant le précurseur de la voie de biosynthèse du caoutchouc, il représente un facteur limitant de la production de latex et de la régénération (Tupy, 1973a, b, c, d ; Low et Gomez, 1982 ; Tupy et Primot, 1982 ; Eschbach *et al.*, 1986 ; Tupy, 1989 ; Lacrotte, 1991). Par conséquent, sa concentration dans le latex donne des indications sur le métabolisme des cellules laticifères. Mais l'interprétation de ce paramètre est complexe car la concentration en saccharose représente le bilan de l'import du saccharose et l'utilisation effective de celui-ci pour le métabolisme. Une concentration élevée peut traduire soit un bon approvisionnement des cellules laticifères et une forte activité de ces cellules (Tupy et Primot, 1976), soit une faible utilisation du saccharose due à une faible activité métabolique.

- La concentration en phosphate inorganique (Pi) :

Le phosphate inorganique est considéré comme un indicateur de l'intensité du métabolisme énergétique des cellules laticifères (Jacob *et al.*, 1988) car il est impliqué dans le catabolisme glucidique (Jacob 1970a, b, c) et dans la biosynthèse du caoutchouc (Lynen, 1969). Il intervient dans la synthèse des nucléotides impliqués dans les transferts d'énergie chimique (ATP) ou porteurs de pouvoir réducteur ($NAD(P)H/NAD(P)^+$). Sa concentration est fortement corrélée à la production (d'Auzac 1964b, Subronto, 1978 ; Eschbach *et al.*, 1984).

- La concentration en groupements thiols :

Ils ont sous leur forme réduite un rôle majeur d'antioxydant. Ils protègent les membranes des organites (les lutoïdes, les particules de Frey-Wyssling) des formes activées de l'oxygène. Ce

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

	Low Metabolism Met-	Low-Medium Metabolism Met -=	Medium Metabolism Met =	Medium-High Metabolism Met =+	High Metabolism Met +
Low Sugar Loading (Suc -)	*Typology c1* *Met -* *Suc -* AVROS 2037	*Typology c3* *Met -=* *Suc -* MEDIUM STIM	*Typology c6* *Met =* *Suc -* LOW STIM	*Typology c9* *Met =+* *Suc -* VERY LOW STIM	*Low probability*
Medium Sugar Loading (Suc =)	*Typology c2* *Met -* *Suc =* AF 261 VERY HIGH STIM	*Typology c4* *Met -=* *Suc =* PB 86 PR 107 HIGH STIM	*Typology c7* *Met =* *Suc =* GT1 PB 254 RRIC 100	*Typology c10* *Met =+* *Suc =* RRIM 600 PB 5/51 BPM 1 IRCA18 BPM 24 IRCA 109 RRIC 110 PB 330 PR 255	*Typology c12* *Met +* *Suc =* PB 235 RRIM 911 PB 260 PR 261 PB 340 IRCA 111 RRIM 901 IRCA 130 IRCA 209
High Sugar Loading (Suc +)	*Low probability*	*Typology c5* *Met -=* *Suc +* PB 217	*Typology c8* *Met =* *Suc +* RRIC 121	*Typology c11* *Met =+* *Suc +* IRCA 19 IRCA 41 RRIM 921	*Typology c13* *Met +* *Suc +* IRCA 230 RRIM 712

Tableau I : Typologie Clonale de l'hévéa dans les zones traditionnelles, CIRAD-CP

Modélisation physiologique servant de base pour la sélection clonale et la recommandation de systèmes d'exploitation.
(fréquence de saignée, l'intensité de la stimulation r pour réduire les fréquences de saignées)
L'intensité de la stimulation doit être diminuée de gauche (faible métabolisme) à droite (métabolisme actif).
L'intensité de la stimulation doit être augmentée de haut (faible chargement en sucres) en bas (fort chargement en sucres).

Clone à fort rendement potentiel

Diagonale d'en haut à gauche à en bas à droite : recommandations homogènes de stimulation

d'après Gohet *et al.*, 2003

sont également des activateurs d'enzymes clés comme l'invertase (Jacob *et al*., 1982) et la pyruvate kinase (Jacob *et al*., 1981). Il existe une forte corrélation positive entre la concentration en thiols réduits et la production de latex (d'Auzac, 1965a, b ; Crétin et Bangratz, 1983 ; Eschbach *et al*., 1984).

2.4. Les principaux clones commerciaux :

Les clones utilisés aujourd'hui en plantation ont surtout été sélectionnés pour leur rendement de production. Leur étude a permis de montrer qu'en absence de stimulation hormonale leur système laticifère pouvait être plus ou moins performant et actif. Cette constatation a conduit à l'établissement d'une classification des clones cultivés selon le fonctionnement métabolique de leur système laticifère, appelée Typologie Clonale (Eschbach *et al*., 1984 ; Jacob *et al*., 1985 ; Prévôt *et al*., 1986 ; Commère et Eschbach, 1988 ; Gohet *et al*., 1991 ; Serres *et al*., 1994 ; Jacob *et al*., 1995 ; Gohet *et al*., 1996 ; Gohet *et al*., 2003).
La classification ancienne consistait en trois classes de clones (Jacob *et al*., 1995d) :

- Les clones à métabolisme peu actif tels que AF261, AVROS2037, PB86, PR107

Ces clones présentent un indice d'obstruction (plugging index) très élevé, ce qui implique un écoulement difficile. En conséquence, en absence de stimulation, les clones de cette catégorie ont une production faible, due à une activité métabolique faible. La concentration en Pi du latex est faible alors que celle en sucres est élevée, car ils ne sont pas métabolisés.
Ces clones montrent une très bonne réponse à la stimulation hormonale et voient ainsi leur production augmenter très significativement. Il est également important de noter que cette catégorie de clones est généralement peu sensible au syndrome de l'encoche sèche (arrêt de la production de latex dû à une surexploitation de l'arbre).

- Les clones à métabolisme moyennement actif comme PB217, GT1, PB254, RRIM600

Ils sont caractérisés par un écoulement plus facile et une production moyenne. La concentration en Pi de leur latex reflète une activité métabolique moyenne. Certains de ces clones possèdent beaucoup de saccharose (PB217) et d'autres moins (GT1). L'intensification de l'exploitation par la stimulation hormonale permet d'activer significativement le métabolisme dans la limite du sucre disponible dans les laticifères.

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

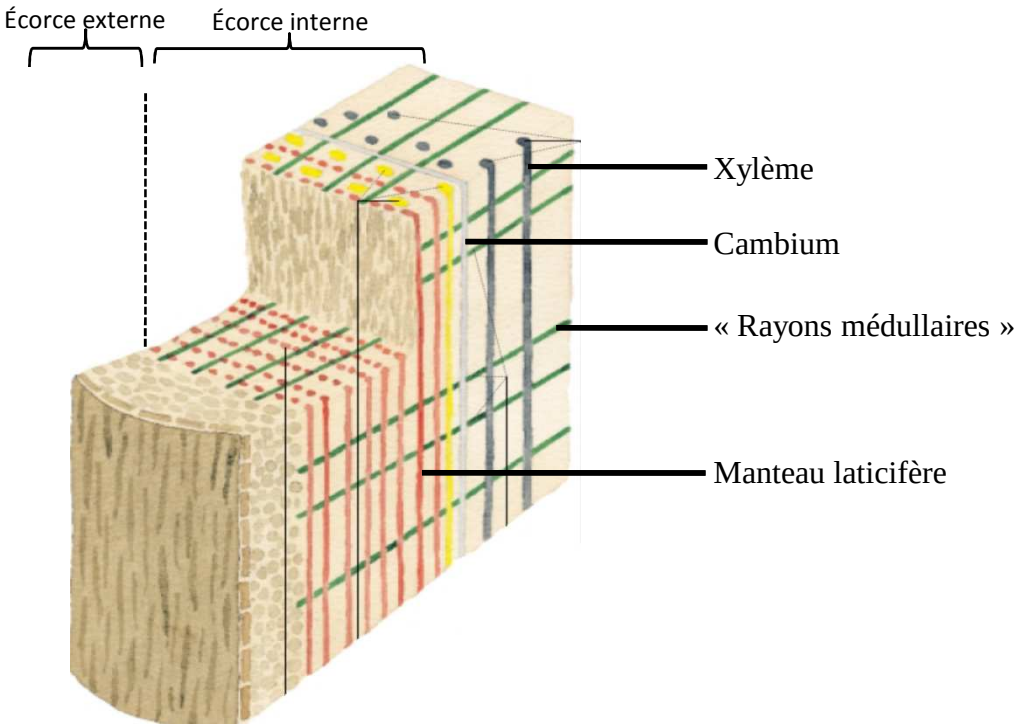


Figure 14 : Schéma 3D d'une coupe de tronc d'hévéa mature

Représentation schématique en trois dimensions de la structure du tronc d'hévéa. Les écorces externe et interne sont représentées. Dans l'écorce interne, on retrouve le xylème, le phloème, le cambium, les rayons médullaires ou vaisseaux transversaux et les manteaux laticifères concentriques.
D'après Jacob *et al.*, 1989

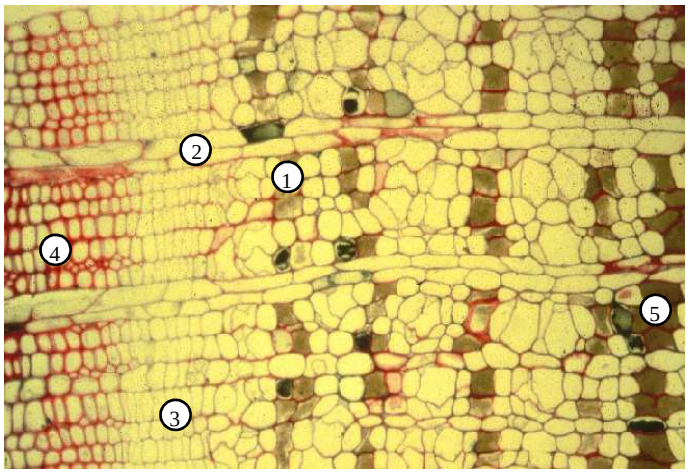


Figure 15 : Coupe transversale d'écorce d'hévéa

Photo réalisée au microscope optique d'une coupe transversale de tronc d'hévéa mature. Les différentes structures de la figure 16 sont retrouvées ici. (1) Manteau Laticifère (2) Rayon Médullaire (3) Cambium (4) Xylème (5) Phloème.
D'après de Faÿ, 1989

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

- Les clones à métabolisme très actif tels que PB235, PB260, IRCA230, RRIM712

Ils présentent en absence de toute stimulation une forte production, en partie due à un écoulement très facilité et une activité métabolique élevée. Leurs caractéristiques sont une teneur en Pi très élevée et en sucres très faible. La stimulation hormonale ne permet qu'une activation modérée du métabolisme et le risque de surexploitation est important. Ces clones sont plus sensibles au syndrome de l'encoche sèche.

Aujourd'hui cette classification est beaucoup plus complexe, mais s'appuie toujours sur les paramètres du DL. Elle fait appel à deux critères essentiels : l'activité métabolique (cinq catégories) et la capacité de chargement en saccharose (trois catégories). Au total ce sont 15 classes de clones différentes qui sont dénombrées (en pratique, deux de ces classes ne sont pas représentées ; tableau I). Cette typologie sert maintenant de base pour la sélection et les recommandations d'exploitation (modes de saignée, stimulation… ; Gohet *et al.*, 2003).

3. Les cellules laticifères : un modèle unique

Les cellules laticifères sont des cellules hautement spécialisées et entièrement dédiées au métabolisme de la biosynthèse du caoutchouc. Elles sont organisées en couches concentriques isolées et indépendantes.

3.1. Physiologie

Les cellules laticifères sont différenciées cycliquement et de façon centrifuge à partir du cambium. Elles sont donc organisées en couches monocellulaires concentriques appelées manteaux laticifères (figures 14 et 15). Chaque manteau est indépendant des autres mais très rapidement les cellules d'un même manteau s'anastomosent les unes aux autres. En effet, à la maturité de la cellule, des vésicules enzymatiques fusionnent avec la paroi et de profondes perforations sont ainsi créées (figure 16). Ces perforations font des manteaux laticifères une structure articulée, un véritable réseau : les cellules laticifères d'un même manteau communiquent physiquement entre-elles.

Les cellules laticifères sont des entités hétérotrophes, c'est-à-dire qu'elles doivent importer les assimilats photosynthétiques (produits aux niveaux des feuilles) pour répondre à leurs besoins énergétiques et en squelettes carbonés. Une autre caractéristique de ces cellules est qu'elles sont dépourvues de plasmodesmes. Par conséquent, elles doivent nécessairement faire appel à

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

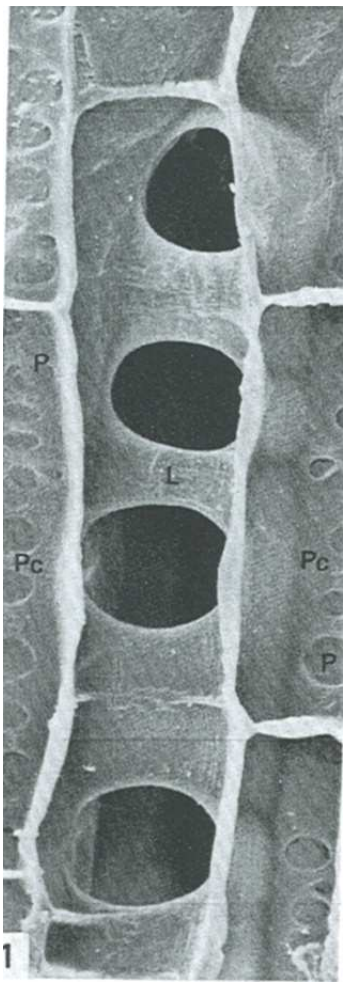


Figure 16 : Coupe longitudinale d'un vaisseau laticifère

Photo au microscope électronique à balayage d'une coupe d'un vaisseau laticifère avec ses perforations. Les cellules du parenchyme avec des ponctuations sont également visibles.
MEB X10 000 (décapage)
d'après d'Auzac, Jacob et Chrestin, 1989

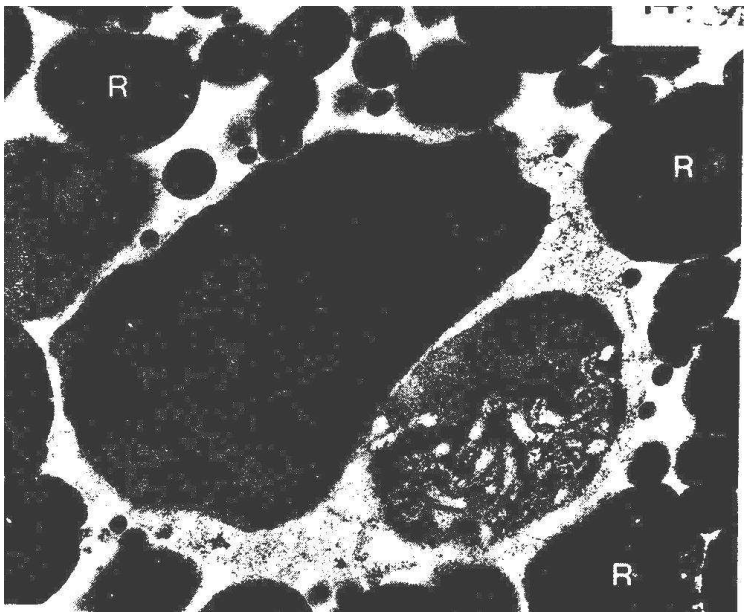


Figure 17 : Particule de Frey-Wissling et particules de caoutchouc

Photo au microscope électronique à balayage d'une particule de Frey-Wissling et des particules de caoutchouc environnantes.
X 21 000 (Hébant, 1989)

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

des transporteurs énergisés de la membrane plasmique pour importer activement les assimilats. Nous pouvons toutefois noter la présence de rayons médullaires qui traversent le tronc de façon transversale et relient ainsi les tissus conducteurs (phloème et xylème) aux autres parties de l'écorce (figures 14 et 15).

3.2. Le latex

Au sens physiologique, le latex est réellement le cytoplasme des cellules laticifères (Andrews et Dickenson, 1960 ; Hébant et de Faÿ, 1980 ; Hébant, 1981). Lors de la saignée, les cellules laticifères se vident de tout leur contenu à l'exception des noyaux et mitochondries. Ces derniers étant indispensables à la régénération, ils sont maintenus dans les cellules laticifères lors de la saignée grâce à leur ancrage spécifique à la paroi, *via* le cytosquelette. En conséquence, le latex contient tous les autres organites de la cellule laticifère : i) les lutoïdes, qui sont une fraction membranaire vésiculée équivalente au système vacuo-lysosomal des végétaux supérieurs (d'Auzac *et al.*, 1982 ; d'Auzac *et al.*, 1989) ; ii) le réticulum endoplasmique ; iii) les ribosomes libres ou groupés ; iv) les particules de Frey-Wyssling, qui sont des sortes de plastes dégénérés, remplis de caroténoïdes (Frey-Wissling, 1932 ; Gomez, 1976) ; v) et surtout de très nombreuses particules de caoutchouc en suspension (figure 17). Elles sont constituées de molécules de *cis*-polyisoprène, entourées d'une membrane phospholipoprotéique associée à des polysaccharides complexes (Gomez et Moir, 1979).

3.2.1. La biosynthèse du caoutchouc

Cette biosynthèse se déroule dans le cytoplasme des cellules laticifères (figure 18), et représente 90% de la matière sèche totale produite (Gohet, 1996). Elle peut être divisée en deux séquences (figure 18). La première correspond à la glycolyse et fournit à partir du saccharose les trois éléments nécessaires à la synthèse du caoutchouc : l'acétate (précurseur du polymère), l'ATP (énergie) et le NADPH (pouvoir réducteur). La seconde séquence est la biosynthèse proprement dite du cis-polyisoprène à partir de l'acétyl-CoA (d'Auzac, 1965a et b ; Lynen, 1969). Deux voies sont aujourd'hui proposées pour cette deuxième séquence. L'une avérée et décrite depuis longtemps dans la littérature, c'est la voie dépendante du mévalonate (MVA ; Jacob *et al.*, 1989a) . L'autre, proposée récemment au vu des résultats

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

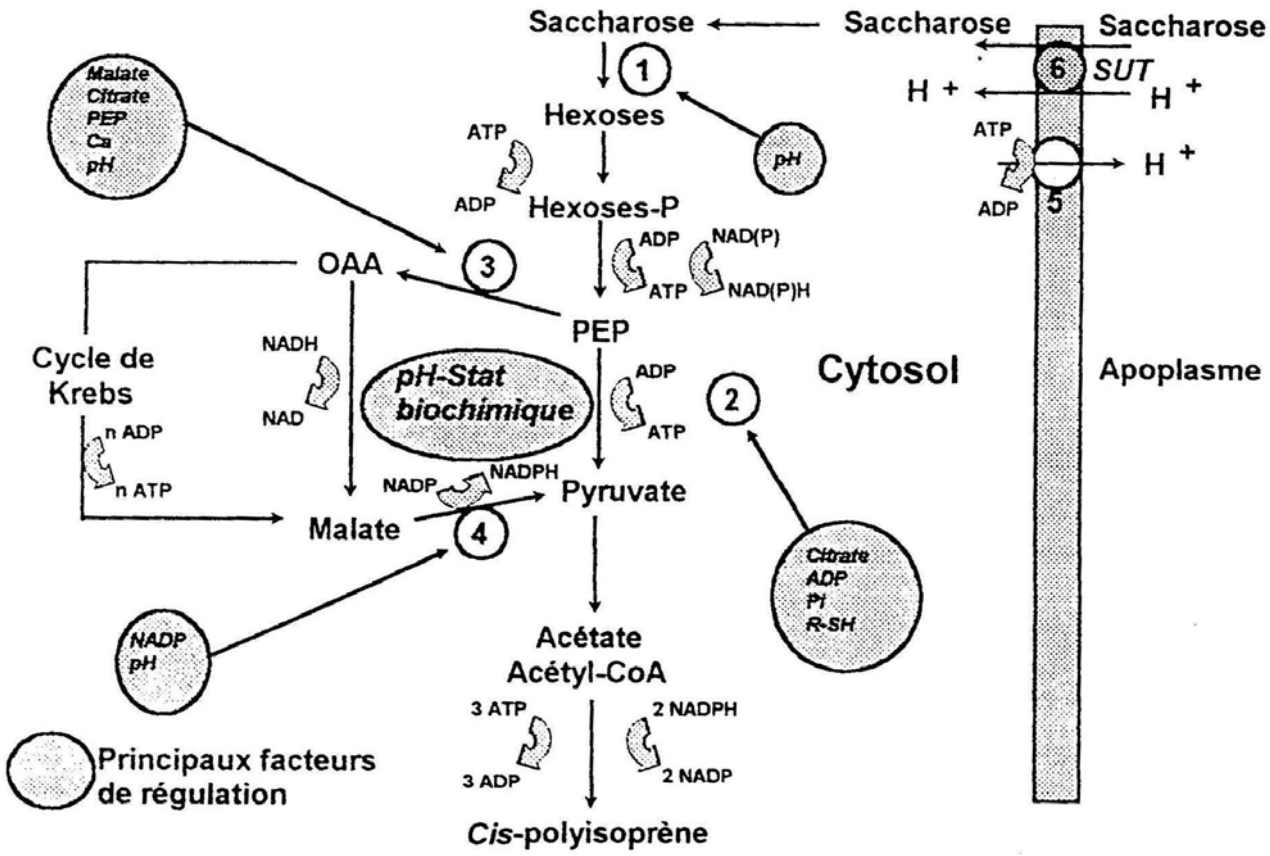


Figure 18 : Représentation simplifiée du métabolisme laticigène et de sa régulation (d'après Jacob *et al.*, 1989a)

Le saccharose pénètre dans le cytosol *via* un co-transporter H+/saccharose (6). Ce transport est énergisé par le gradient électrochimique de protons crée par le fonctionnement d'une H+-ATPase plasmalemmique (5).
La glycolyse est initiée par le une invertase (1) qui hydrolyse le saccharose en hexoses, eux-mêmes utilisés pour former du phosphoénolpyruvate (PEP). Puis la pyruvate kinase transforme le PEP en pyruvate. Cette étape est régulée par un pH-stat biochimique qui fait intervenir la PEP carboxylase (3) et l'enzyme malique (4).
Les cofacteurs NADPH et ATP formés lors de la glycolyse sont utilisés lors de la transformation ultérieure de l'acétyl-CoA en *cis*-polyisoprène.

d'analyses transcriptomiques, est sujette à controverse. Il s'agit de la voie dépendante du 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate/2-C-methyl-D-erythritol (MEP ; Ko *et al.*, 2003).

3.2.1.1. La Glycolyse

Elle joue un rôle essentiel puisqu'elle fournit les squelettes carbonés, l'énergie et le pouvoir réducteur nécessaires pour la synthèse du caoutchouc. Son existence dans le manteau laticifère a été démontrée depuis très longtemps (d'Auzac *et al.*,1964a ; Tupy et Resing, 1969). Elle se déroule entièrement dans le cytosol des cellules laticifères (d'Auzac 1965a et b, d'Auzac et Jacob, 1969 ; Jacob, 1970a, b, c) et est schématisée dans la figure 18. Le saccharose cytosolique est tout d'abord hydrolysé en glucose et fructose (Tupy, 1973 b) par l'invertase cytosolique dont l'activité dépend très fortement du pH (Tupy, 1973 a ; Eschbach *et al.*, 1984, Yeang *et al.*,1984). Cette étape est limitante et contrôle la biosynthèse du caoutchouc et plus généralement la régénération du latex (Tupy, 1973a ; Yeang *et al.*, 1984). L'activité de l'invertase cytolosique reflète parfaitement l'activité métabolique du tissu laticifère (Tupy, 1973d).

Une des particularités du latex est la présence de deux glycéraldéhyde-phosphate déshydrogénases. L'une correspond à l'enzyme classique de la glycolyse (Jacob & d'Auzac, 1972), l'autre catalyse l'oxydation du glycéraldéhyde-3-phosphate en 3-phosphoglycérate et joue un rôle important dans la régénération du NADPH, cofacteur essentiel de la synthèse du caoutchouc (Hepper et Audley, 1969 ; Lynen, 1969).

Une autre étape essentielle de la glycolyse est le carrefour phosphoénolpyruvique, qui peut orienter le métabolisme cellulaire vers des voies différentes de celle de la synthèse du caoutchouc. L'activité de la phosphoénolpyruvate carboxylase (PEPCase, Jacob *et al.*, 1978, 1979) peut dévier le catabolisme glucidique vers le cycle de Krebs. Cette étape va conditionner la disponibilité en phosphoénolpyruvate (PEP), dont dépend l'activité de la pyruvate kinase (Jacob *et al.*, 1981, 1982).

3.2.1.2. La biosynthèse isoprénique

La molécule de caoutchouc est une macromolécule constituée par l'enchaînement d'unités isopréniques à cinq carbones. Le maillon unitaire, le pyrophosphate d'isopentényle (PPI) est polymérisé pour donner des molécules de *cis*-polyisoprène (figure 4) dont la masse moléculaire peut dépasser 10^3 kDa (Archer et Audley, 1987).

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

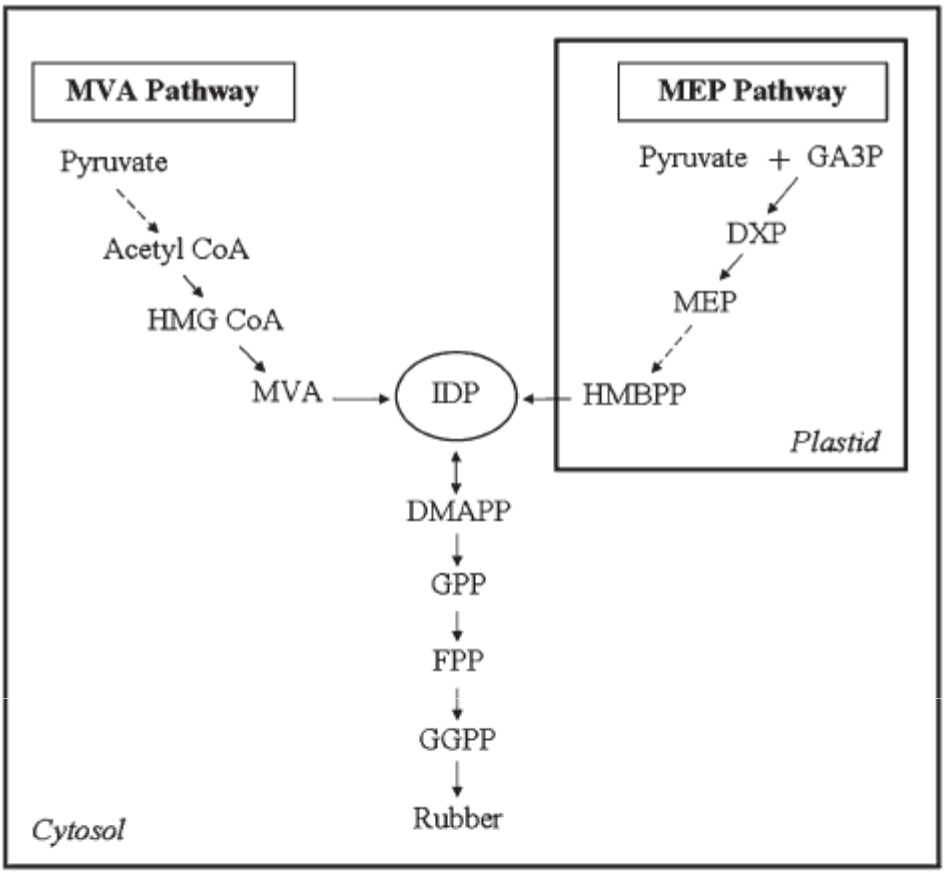


Figure 19 : Biosynthèse du caoutchouc
L'Inositol Di-Phosphate (IDP), précurseur de la biosynthèse du caoutchouc peut être obtenu par la voie du mévalonate (MVA) ou la voie du xylulose 5-phosphate/2-C-methyl-D-erythritol (MEP).
Les flèches pointillés indiquent des étapes multiples.
HMG-CoA : 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A
GA-3P: Glyceraldéhyde- 3Phosphate
DXP: 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate
HMBPP: 1-hydroxy-2-methyl-2-butenyl-4-diphosphate
DMAPP: dimethylallyl diphosphate
GPP: Géranyl PyroPhosphate
FPP: Farnésyl PyroPhosphate
GGPP: géranylgéranyl diphosphate

3.2.1.2.1. La synthèse de l'Acétyl-CoA

L'acétyl-CoA a été défini comme précurseur de la biosynthèse du caoutchouc chez l'hévéa (Archer et Cockbain, 1969 ; Lynen, 1969). Plusieurs voies peuvent conduire à l'acétyl-CoA (Jacob *et al.*, 1989a) : i) directement à partir du pyruvate *via* la pyruvate déshydrogénase, ii) par la voie de l'acétate (Lynen, 1969) grâce à l'acétyl-CoA synthétase qui lie une molécule de coenzyme A à une molécule d'acétate en présence d'un ATP ou iii) par décarboxylation du pyruvate en acétaldéhyde par une pyruvate décarboxylase du cytosol puis synthèse de l'acétyl-CoA par l'acétaldéhyde déshydrogénase (Jacob, 1970 ; Tupy et Primot, 1976). Cette étape de formation de l'acétyl-CoA, bien qu'étant une des étapes clés du métabolisme isoprénique, est encore mal caractérisée chez l'hévéa.

3.2.1.2.2. La voie du MVA

La première étape, réalisée en deux temps, aboutit à l'association de trois molécules d'acétyl-CoA pour former une molécule de 3-hydroxy-3-méthyl-glutaryl-CoA (HMG-CoA, Wititsuwannakul *et al.*, 1990) *via* l'acétyltransférase puis la HMG-CoA synthétase (figure 19). Ensuite l'HMG-CoA est réduit en acide mévalonique, élément essentiel car précurseur du maillon unitaire de la molécule de caoutchouc : le PPI (Lynen, 1969 ; Sipat, 1982). La formation du mévalonate dans le latex par la HMG-CoA réductase, enzyme membranaire, nécessite deux molécules de NADPH (Hepper et Audley, 1969 ; Sipat, 1982). Le mévalonate est alors transformé en PPI par trois enzymes cytosoliques : la mévalonate kinase, la phosphomévalonate kinase et la diphosphomévalonate décarboxylase, ce qui nécessite trois molécules d'ATP (Williamson et Kekwick, 1965).

Le PPI est ensuite isomérisé par la PPI isomérase en pyrophosphate de diméthylallyle (PPDMA), qui est indispensable à l'initiation de la chaîne isoprénique (Barnard, 1965). L'addition successive de trois molécules de PPI par la prényltransferase cytosolique, permet la synthèse du pyrophosphate de farnésyle (15 carbones), initiateur de l'élongation du polymère (Cornish et Backhaus, 1990).

L'allongement du polymère s'effectue par additions répétées de molécules de PPI au polymère en formation. Ces additions, toujours en position *cis*, sont catalysées par une prényltransférase localisée sur les membranes entourant les particules de caoutchouc (Light et Dennis, 1989) et associée à un facteur d'élongation (RER : Rubber Elongation Factor ; Dennis et Light, 1989).

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

3.2.1.2.3. La voie du MEP

Proposée récemment (Ko *et al.*, 2003 ; Chow *et al.*, 2007), elle est encore mal caractérisée et son rôle dans la synthèse de caoutchouc fait l'objet de débat. Suite à des analyses transcriptomiques, des enzymes clés de cette voie de biosynthèse ont été détectées dans le latex. Cette voie est déjà caractérisée chez les bactéries et les végétaux comme la seconde voie de biosynthèse des isoprénoïdes (Lichtenthaler, 1999; Rodriguez-Concepcion et Boronat, 2002). Ce sont les premières étapes, conduisant à la synthèse du PPI qui diffèrent de la voie classique (figure 19). Celles-ci ont lieu dans les plastes et passe par la synthèse du 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate/2-C-methyl-D-erythritol (MEP, figure 19). Des études moléculaires récentes basées sur des analyses de séquences et d'expression ont montré que les enzymes clés de cette voie, les 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomérases (DXRs) intervenaient dans la synthèse des isoprénoïdes en général chez l'hévéa et probablement dans la biosynthèse du caoutchouc (Seetang-nun *et al.*, 2008). Cependant, des expériences de suivi d'incorporation du [1-13C] 1-déoxy-D-xylulose triacétate, un intermédiaire de la voie du MEP, ont mis en évidence qu'elles étaient plutôt impliquées dans la biosynthèse des caroténoïdes (Sando *et al.*, 2008). Par conséquent, il apparaît aujourd'hui que la biosynthèse du caoutchouc est complexe et encore mal comprise.

3.2.1.3. Régulation de la biosynthèse du caoutchouc

La régénération du latex peut être régulée par un nombre important de facteurs biochimiques et/ou biophysiques comme l'approvisionnement en sucres, le pH cytosolique, l'équilibre ionique et la régulation d'enzymes clés (figure 18). Les modes de régulation les mieux caractérisés sont :

- L'approvisionnement en sucres :

La biosynthèse du caoutchouc est placée sous le contrôle de l'intensité du métabolisme glucidique (Tupy, 1984 ; Lacrotte, 1991). Or celle-ci dépend de la capacité des cellules laticifères à absorber et à métaboliser les sucres solubles. Ce paramètre essentiel de la synthèse isoprènique semble être, au moins en partie, sous le contrôle de transporteurs de sucres dont la régulation reste jusque là non étudiée.

- La régulation du pH cytosolique :

Le pH cytosolique joue un rôle majeur au sein du métabolisme des laticifères, en contrôlant notamment l'activité de l'invertase cytosolique qui initie la glycolyse (Tupy, 1973a ; Primot, 1977b). Le pH cytosolique contrôle également le carrefour phosphoénolpyruvique : soit le

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

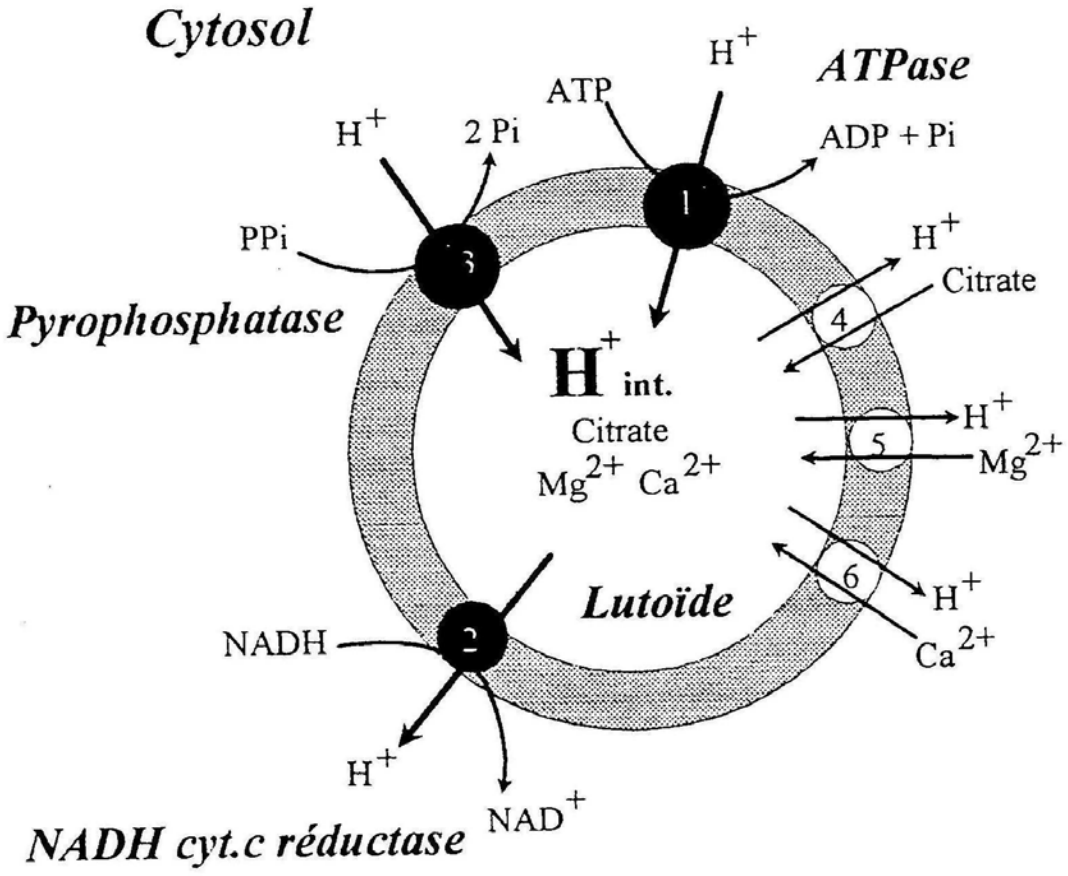


Figure 20 : Représentation schématique du rôle des lutoïdes dans le contrôle du pH et de l'homéostasie du cytosol du latex d' ***Hevea brasiliensis***

Les lutoïdes jouent un double rôle de pH-stat biophysique et de piégage, par compartimentaiton, des ions et solutés ayant une action inhibitrice des réactions enzymatiques cytosoliques, notamment le citrate, Mg^{2+} et Ca^{2+}.

Une H+/ATPase tonoplastique (1) et une pyrophosphatase tonoplastique (3) fonctionnant à l'opposé d'un système redox à NADH (NADH-cytochrome c-réductase), lui aussi tonoplastique (2). Les deux premières pompes (1) et (3) génèrent la force proton-motrice nécessaire à l'énergisation des antiporteurs tonoplastiques citrate-H^+ (4), Mg^{2+}-H^+ (5) et Ca^{2+}-H^+ (6) et permettent le stockage des inhibiteurs métaboliques (citrate, Mg^{2+}, $Ca2^+$) au sein des lutoïdes.

La seconde pompe (2) permet la régulation simultanée du pH cytosolique en réduisant le gradient électrochimique de protons crée lors du fonctionnement de l'ATPase tonoplastique (1) et de la PPase (3).

D'après Chrestin *et al.*, 1989 et Gohet, 1996

phosphoénolpyruvate est destiné à la synthèse de l'oxaloacétate *via* la PEP carboxylase (PEPCase du cycle de Krebs), soit il est détourné vers la synthèse du pyruvate et de l'acétate, précurseur de la biosynthèse du caoutchouc, *via* la pyruvate kinase (Jacob *et al.*, 1983).

La régulation du pH cytosolique se fait essentiellement grâce à un pH-stat biochimique impliquant deux enzymes : la PEPCase et l'enzyme malique. La PEPCase transforme le PEP en malate, à son tour transformé en citrate par la malate déshydrogénase et la citrate synthase (Jacob, 1970a). Le malate et le citrate sont des inhibiteurs de la PEPCase en milieu acide (Jacob *et al.*, 1979 ; 1983). L'enzyme malique intervient également dans la régulation du pH cytosolique, en provoquant de façon irréversible la décarboxylation du malate en pyruvate (acide faible). Ceci permet une réalcalinisation du cytosol et la régénération du NADPH, cofacteur strict de l'enzyme malique (Jacob *et al.*, 1981).

Il existe également un système de pH-stat biophysique pour réguler le pH cytosolique (figure 20). Celui-ci est constitué de deux systèmes de transport des protons inversés, situés sur la membrane des lutoïdes (Marin, 1981 ; Chrestin, 1984). L'une est une ATPase pompe à H^+, responsable de l'alcalinisation du cytosol (Crétin, 1982) et l'autre est une chaîne redox qui acidifie le cytosol (Moreau *et al.*, 1975 ; Crétin, 1983). Ce système de régulation du pH est représenté dans la figure 20.

- Equilibre ionique du cytosol :

Les lutoïdes sont capables, à l'image des vacuoles, de stocker des ions, contre leurs gradients de concentrations grâce à des processus actifs (figure 20). Il s'agit essentiellement du magnésium, du calcium et du citrate (Chrestin *et al.*, 1989) *via* des transporteurs apparemment relativement spécifiques (Ribaillier, 1972 ; d'Auzac et Lioret, 1974 ; Coupé et Lambert , 1977, Marin, 1981 ; Chrestin, 1984, Chrestin *et al.*, 1989 ; Amalou et Chrestin, 1992 ; Amalou *et al.*, 1994). Ces systèmes de transports, énergisés et présents sur la membrane lutoïdique, permettent en concentrant ces ions et solutés dans le compartiment vacuolaire de maintenir et réguler le catabolisme glucidique au sein du cytosol. En effet, ces ions sont des régulateurs des différentes enzymes clés de la synthèse isoprènique. Le magnésium est un inhibiteur de l'invertase cytosolique (Jacob, 1970a ; Tupy et Primot, 1976) et des phosphatases acides (Jacob et Sontag, 1974) ; le calcium est un inhibiteur de la pyruvate kinase et intervient dans les mécanismes de phosphorylation des enzymes et enfin le citrate est un inhibiteur de l'invertase cytosolique et de la pyruvate kinase (Jacob, 1970a). Par conséquent les lutoïdes jouent un rôle primordial dans le contrôle de l'intensité du métabolisme des laticifères et donc dans la régulation de la régénération du latex (Chrestin *et al.*, 1984 a et b, 1985a, 1989).

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

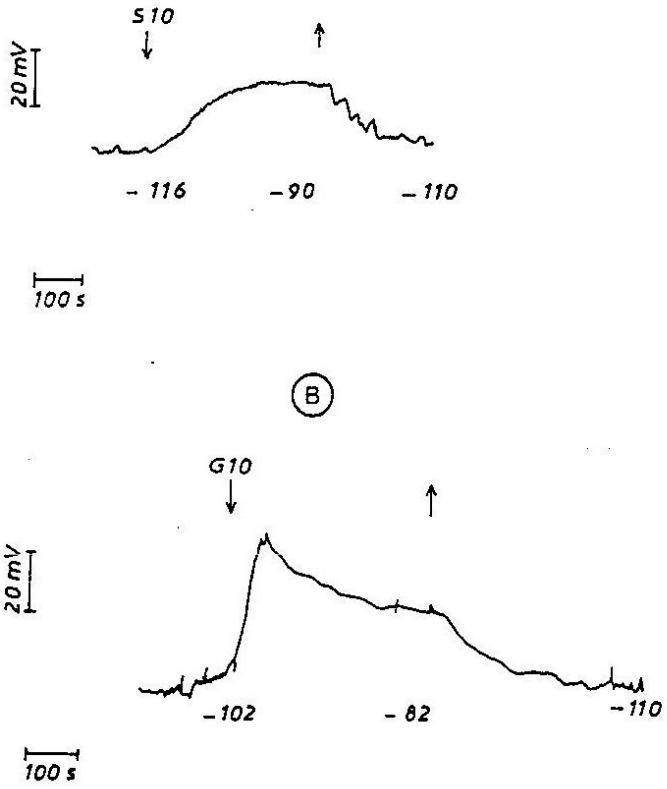


Figure 21 : Premières études d'electrophysiologie (Lacrotte, 1991)
Dépolarisation du plasmalemme d'un laticifère du clone RRIM 600 en présence de (A) saccharose 10 mM et de (B) glucose 10 mM dans le milieu de percolation.

3.2.2. Import des assimilats

Après chaque récolte du latex, les cellules laticifères doivent régénérer complètement leur cytoplasme ainsi que la majorité des organites qu'elles contiennent. C'est pourquoi ces cellules ont un métabolisme particulier et hautement spécifique, dédié à la biosynthèse du caoutchouc et à la régénération. Elles représentent un organe puits très actif qui utilise les assimilats synthétisés par d'autres organes sources (feuilles) pour répondre à ses besoins en énergie et squelettes carbonés. L'absence de plasmodesmes au niveau de ces cellules plaide en faveur d'un rôle central des transporteurs de sucres dans leur approvisionnement en sucres solubles.

Les études concernant le transport des sucres ont principalement été menées à l'aide de technique d'électrophysiologie. Les premiers résultats obtenus sur de jeunes tiges dépourvues de cuticule épidermique, ont permis d'émettre l'hypothèse de la présence d'un transport actif des sucres de l'apoplasme vers le cytosol couplé à un transport de protons (Lacrotte, 1991). Cette hypothèse est basée sur l'observation d'une dépolarisation membranaire induite par le saccharose et le glucose (figure 21), totalement inhibée en présence de phloridzine (inhibiteur des transporteurs de glucose). De plus, cette étude montre une activation de l'influx de sucres par l'application d'éthylène. Selon le même auteur, l'augmentation de l'activité des co-transporteurs H^+/sucres serait due à l'activation de la pompe H^+/ATPase par l'éthylène, qui induirait une alcalinisation du cytosol (Lacrotte, 1991).

L'utilisation des modèles plus simples comme les cellules laticifères entières ou les protoplastes de cellules laticifères a permis de soutenir l'hypothèse de la présence de co-transporteur H^+/sucres au niveau de la membrane plasmique des cellules laticifères. Ainsi, l'incubation des cellules laticifères ou des protoplastes en présence de saccharose ou de glucose conduit à une dépolarisation de la membrane plasmique (Bouteau *et al.*, 1992). Ces mêmes expériences réalisées en présence de certains inhibiteurs tels que le vanadate (inhibiteur spécifique de la pompe H^+/ATPase plasmalemmique), le DNP (2,4-dinitrophénol : protonophore) et la phloridzine (inhibiteur du symport H^+/glucose) n'indiquent plus de dépolarisation en présence de ces sucres (Bouteau *et al.*, 1992). Enfin, la stimulation de la pompe H^+/ATPase par l'éthylène, augmente la dépolarisation induite par le saccharose et le glucose (Bouteau *et al.*, 1992).

Des travaux plus récents soulignent que les cellules laticifères sont capables d'absorber une grande variété de sucres tels les pentoses, les hexoses, les diholosides, et les oligosaccharides (comme le raffinose, Bouteau *et al.*, 1999). D'après ces auteurs, tous les

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

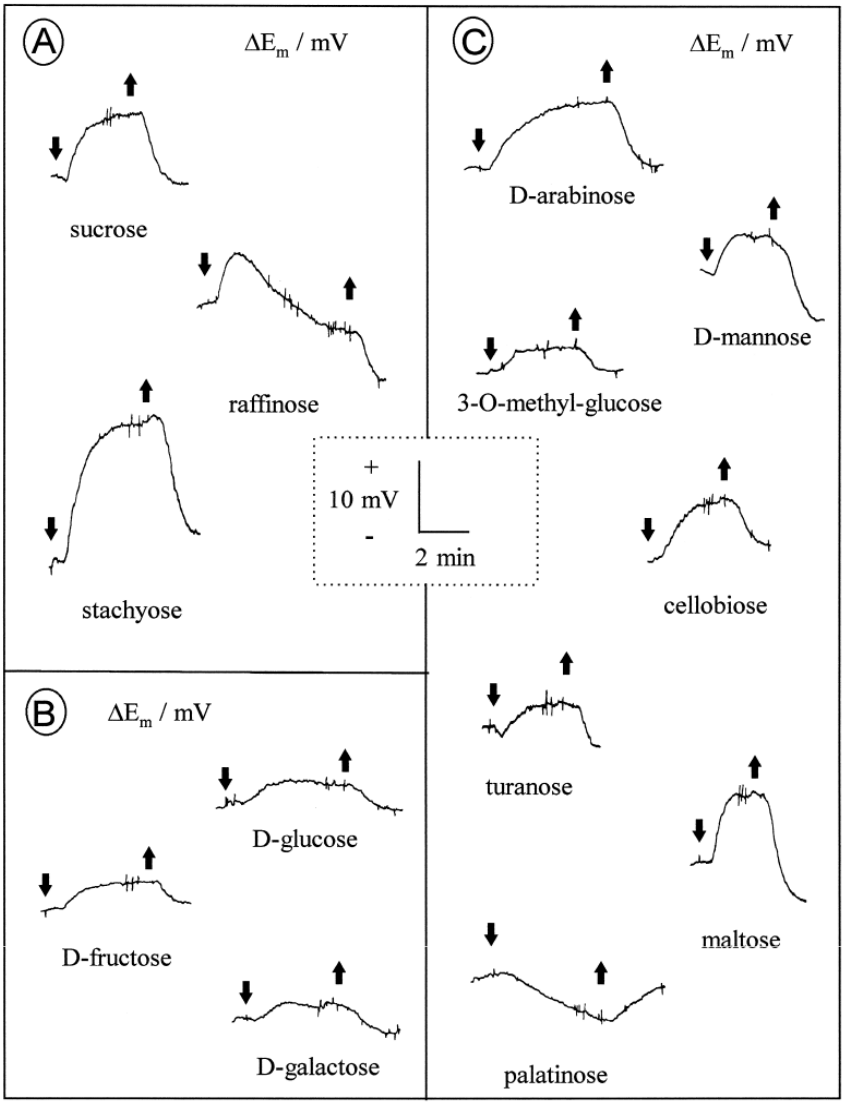


Figure 22 : Dépolarisation de la membrane plasmique (ΔEm) de protoplastes de cellules laticifères en présence de différents sucres à 0,1 mM

A. Sucres correspondant of formes de transport à longue distance du carbone:
Sucrose (α-D-glucopyranosyl-[1-2]-β-D-fructofuranose); **Raffinose** (α-D-galactopyranosyl-[1-6]-α-D-glucopyranosyl-[1-2]-β-D-fructofu ranose.; **Stachyose** (α -D-galactopyranosyl-[1-6]-α-D-glucopyranosyl-[1-6]-α-D-glucopyranosyl-[1-2]-β-D-fructofuranose).

B. Produits de digestion par une invertase pariétales des molécules listées en A

C. Autres substrats:
D-arabinose; **3-O-methyl-glucose**, **D-mannose**, **Cellobiose** (β-D-lucopyranosyl-[1-2]-glucopyranose), Turanose (α-D-glucopyranosyl-[1-3]-D-fructopyranose); **Maltose**(α-D-glucopyranosyl[1-4]-D-glucopyranose); **Palatinose** (D-glucopyranosyl-[6-2]-D-fructofuranose)

Les flèches vers le haut et vers le bas indiquent respectivement l'addition et le retrait du sucre dans le milieu.

D'après Bouteau et al., 1999

sucres testés, sauf le palatinose, induisent une dépolarisation (plus ou moins forte) de la membrane plasmique des cellules laticifères (figure 22). Ces données suggèrent que les sucres seraient activement absorbés par la membrane probablement *via* des co-transporteurs H^+/sucres.

En conclusion, de par leur nature même (hétérotrophes, métaboliquement très actives, dépourvues de plasmodesmes) et au vu des données d'électrophysiologie, il semblerait que les cellules laticifères soient le site d'un transport très actif de sucres, impliquant de nombreux co-transporteurs H^+/sucres. Cependant, aucune étude au niveau moléculaire n'avait été entreprise jusqu'à présent.

3.2.3. Effet physiologique de la stimulation ethylénique

Comme nous l'avons précisé précédemment, l'Ethrel® et l'éthylène gazeux sont communément utilisés pour augmenter le rendement en caoutchouc dans les plantations.

Tout d'abord, le principal effet de la stimulation par l'éthylène consiste en une prolongation de l'écoulement et non pas une augmentation de celui-ci (Baptist et de Jonge, 1955). Ce phénomène est dû à une stabilisation des lutoïdes, responsables de la coagulation du latex (Ribaillier, 1972 ; Hanower *et al.*, 1976). Un accroissement des échanges hydriques entre les manteaux laticifères et les tissus environnants, conduisant à une diminution de la viscosité du latex, a aussi été constaté (Jacob *et al.*, 1989b ; Lacrotte, 1991).

Au niveau du transport des sucres, quelques données sont aujourd'hui disponibles sur l'effet de l'éthylène. Ainsi, son application provoque un accroissement de l'import des sucres dans les cellules laticifères (Lacrotte, 1985). Ce phénomène est couplé à une augmentation du métabolisme des sucres (Tupy, 1973b ; Tupy et Primot, 1976 ; Silpi *et al.*, 2006), de l'énergie disponible (Amalou et Chrestin, 1992) et à une hyperpolarisation de la membrane plasmique des laticifères (Bouteau *et al.*, 1992). L'hypothèse avancée repose sur la stimulation par l'ethylène d'une pompe H^+/ATPase, qui en augmentant la force-proton motrice de part et d'autre de la membrane, permettrait ainsi un fonctionnement accru des co-transporteurs H^+/sucres. L'ensemble de ces événements expliquerait l'augmentation du transport et du métabolisme des sucres chez les cellules laticifères après une stimulation éthylénique.

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

Chapitre 2 :

Les sucres

et leurs transporteurs

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

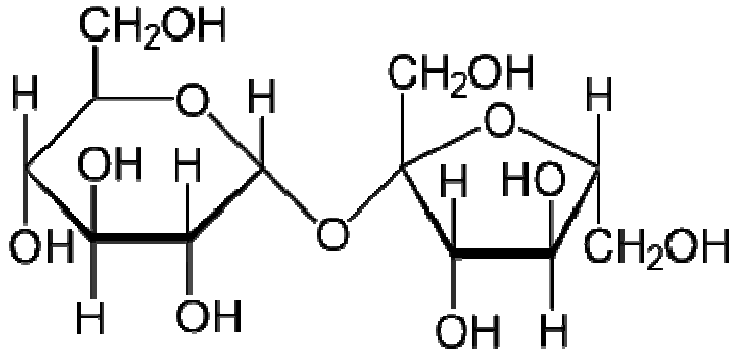


Figure 23 : Formule chimique développée du saccharose

Le saccharose est un diholoside formé d'une molécule de glucose et d'une molécule defructose reliées par une liaison osidique α (1 2)β.

1. Les sucres chez les végétaux

Les sucres représentent la principale source de carbone réduit, transporté *via* le phloème, chez les végétaux. Ils sont abondamment synthétisés au niveau des feuilles lors du processus de la photosynthèse et ensuite transportés à longue distance jusqu'aux organes puits.

1.1. Identification

La principale forme de sucre transporté chez les végétaux supérieurs est le saccharose. C'est un diholoside non réducteur, formé d'une molécule de glucose et d'une molécule de fructose reliées par une liaison osidique α(1->2)β (figure 23). Très récemment, il a été proposé que chez certaines familles végétales (Ranunculaceae et Papaveraceae), les hexoses seraient la forme principale de transport des sucres (Van Bel et Hess, 2008). Toutefois ce processus reste mal connu et ne sera pas traité ici.

1.1.1. Origine photosynthétique

Le saccharose est un produit dérivé de la photosynthèse, qui se déroule dans les feuilles. Brièvement, dans le stroma des chloroplastes, les réactions du Cycle de Benson-Calvin conduisent à la synthèse de trioses-phosphates (Trioses-P) à partir du dioxyde de carbone et de l'énergie chimique (ATP et NADPH). Ensuite, les trioses-phosphates sont exportés vers le cytoplasme des cellules de mésophylle grâce à des transporteurs anti-porteurs Trioses-P/Pi chloroplastiques, où ils servent de précurseurs à la synthèse de Glucose-1-Phosphate (G1P). Le G1P est ensuite associé à une molécule très riche en énergie, l'Uridine Tri-Phosphate (UTP), pour obtenir de l'uridine di-phosphate-glucose (UDPG). L'UDPG, associée au Fructose-6-Phosphate (F6P), permet de former du saccharose. Le saccharose ainsi obtenu, représente le principal composé organique carboné exporté de la cellule chlorophyllienne vers les autres cellules hétérotrophes de la plante.

1.1.2. Sucres de réserve

Les réserves en amidon du tronc sont également une source de carbone pour les organes puits tels que les cellules laticifères. L'amidon est stocké dans les amyloplastes du parenchyme xylémien ou du parenchyme cortical. Brièvement, lors de la mobilisation des réserves (à la reprise de la croissance végétative), l'amidon est hydrolysé en oligosaccharides, maltose et glucose. Cette dégradation fait appel à de nombreuses enzymes comme les

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

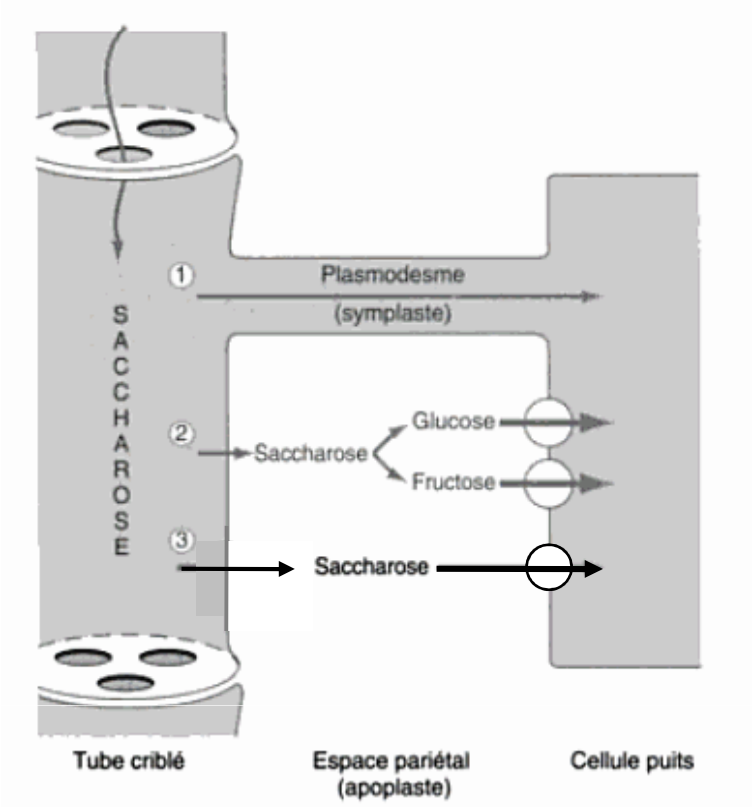


Figure 25 : Schéma simplifié du déchargement du saccharose du phloème

Le déchargement du saccharose peut suivre trois voies.
(1) La voie symplastique : déchargement *via* les plasmodesmes
(2) La voie apoplastique en présence d'une invertase pariétale : Le saccharose libéré dans l'apoplaste est hydrolysé en hexoses, qui eux sont activement chargés dans la cellules puits par des co-transporteurs H+/hexoses
(3) La voie apoplastique en absence d'une invertase pariétale : Le saccharose est directement chargé dans la cellules puits par un co-transporteur H+/saccharose

Pour ces trois voies potentielles, un gradient de diffusion favorisant la migration est maintenu par la métabolisation du saccharose dès son entrée dans la cellule source.

D'après Hopkins, 2003

amylases, l' α-glucosidase, la phosphorylase et deux amidon dikinases (Nielsen *et al*., 1997). Ensuite le glucose peut-être transporté directement ou partiellement transformé en fructose, pour la synthèse du saccharose par la saccharose phosphate synthase. Ce saccharose néoformé peut à son tour être véhiculé vers les organes puits (Wardlaw et Willenbrink, 1994).

1.2. Rôles

Chez les végétaux, les sucres assurent de nombreuses fonctions, ce sont des molécules polyvalentes. Les sucres sont la principale source d'énergie et de carbone des végétaux, et se trouvent donc au carrefour du métabolisme énergétique de la plante. Ainsi, le saccharose issu de la photosynthèse est exporté vers les organes puits (flux de masse) où il intégrera la glycolyse et le cycle de Krebs, pour fournir de l'énergie biochimique sous forme d'ATP. Cette énergie pourra être utilisée directement pour les besoins immédiats de la cellule ou mise en réserve.

Les sucres peuvent également intervenir en tant qu'osmorégulateurs. L'ajustement de la pression osmotique des cellules végétales étant un processus essentiel pour le bon fonctionnement de la plante, de nombreux moyens sont alors mis en œuvre pour en maintenir l'homéostasie. La régulation de la teneur en sucres intracellulaires est un de ces moyens. Ceci explique leur intervention dans la tolérance des plantes aux stress abiotiques telle que la déshydratation (Bernacchia et Furini, 2004). De plus, ils contribuent à la tolérance au gel des plantes (Guy *et al.*, 1992 ; Bourion *et al.*,2003) en tant que molécules cryoprotectrices.

Enfin, les sucres jouent le rôle de molécules « signal », impliquées dans la régulation de divers processus physiologiques et développementaux. A titre d'exemple, les concentrations en saccharose et glucose dans les méristèmes peuvent conditionner l'identité méristématique, la floraison et la différenciation d'organes (Francis et Halford, 2006). Le rôle signal des sucres implique leur perception par la cellule grâce à des senseurs comme la SNF1-related protein kinase-1 (SnRK1) et l'hexokinase (Rolland *et al*., 2001, 2006 ; Moore *et al*., 2003 ; Baena-Gonzalez *et al*., 2007).

1.3. Transport

Après sa synthèse dans les cellules mésophylliennes des feuilles, une partie du saccharose est transportée vers les différents organes puits de la plante, où il sera alors métabolisé.

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

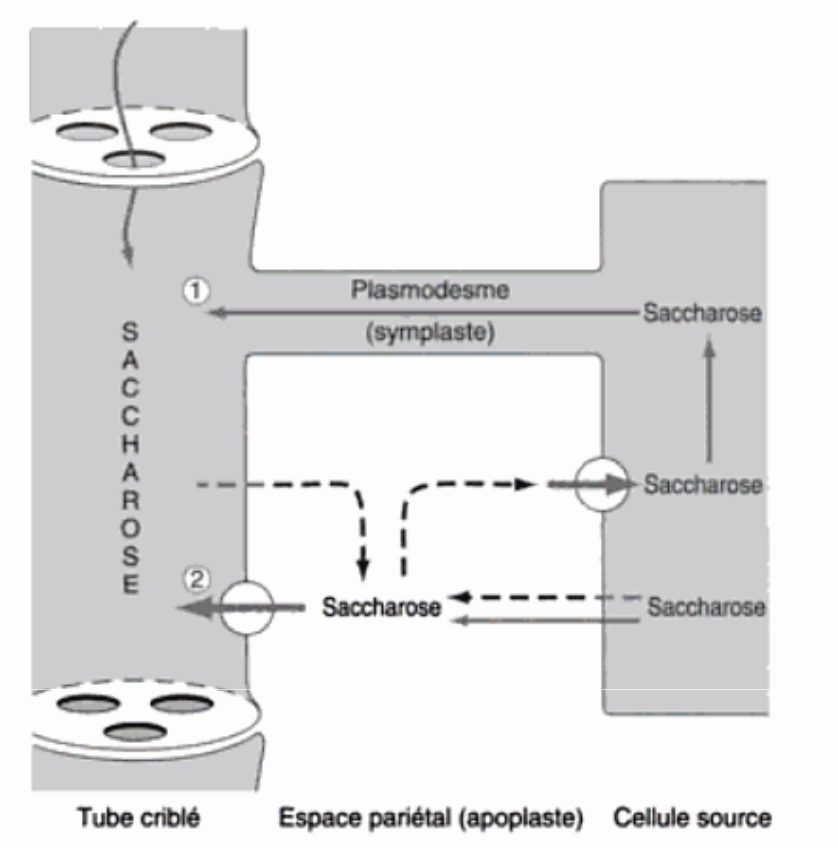


Figure 24 : Schéma simplifié du chargement du saccharose dans le phloème

Le saccharose peut être chargé dans les tubes criblés en empruntant deux voies.
(1) La voie symplastique : le saccharose se déplace via les plasmodesmes
(2) La voie apoplastique : le saccharose est libéré dans l'espace pariétal (apoplasme) puis activement transporté à travers la membrane des tubes criblé par un co-transporteur H^+/saccharose

Le saccharose peut fuir dans l'apoplasme (pointillés) puis être prélevé grâce à un mécanisme actif soit par la cellules source soit par le tube criblé.

D'après Hopkins, 2003

Généralement, les photoassimilats sont chargés dans le phloème avant d'être transportés à longue distance (figure 24). Ce processus appelé, chargement du phloème, peut être réalisé selon deux schémas (Lalonde *et al.*, 2003). Les sucres empruntent soit la voie symplasmique en se déplaçant *via* les plasmodesmes, soit la voie apoplastique qui nécessite des transporteurs spécifiques : co-transporteurs sucres/H^+ (figure 24). Une fois chargés dans les tubes criblés, les sucres sont transportés jusqu'aux organes puits, selon la théorie du Flux de Masse (Münch, 1929), qui repose sur la différence de pression osmotique entre les organes « sources » et les organes « puits ».

Au niveau des organes puits, le déchargement phloémien peut suivre deux modes différents (Lalonde *et al.*, 2003). Le premier s'effectue dans le sens du gradient de concentration du phloème vers le puits *via* un réseau de plasmodesmes, et est qualifié de déchargement symplasmique. La forte concentration en sucres du phloème, l'utilisation et le stockage des assimilats par le puits permettent de maintenir ce gradient de concentration et donc d'entretenir le déchargement du phloème. Ce modèle est fréquent chez les feuilles jeunes, les fruits en développement et les tissus maternels des graines. Le second mode de déchargement (figure 25) utilise la voie apoplastique, et fait appel à des transporteurs de saccharose (en l'absence de l'invertase pariétale, Lingle, 1989) ou d'hexoses (en présence d'une invertase pariétale, Brown *et al.*,1997).

Les échanges entre xylème et phloème permettent également le transport de sucres et d'acides aminés. Cette fonction est assurée par les rayons ligneux (ou « rayons médullaires » chez l'hévéa, Hébant, 1981 ; d'Auzac, 1989), constitués de cellules parenchymateuses orientées horizontalement. Il a été démontré que le saccharose pouvait suivre cette voie chez l'hévéa (D'Auzac *et al.*, 1989).

2. Les transporteurs de sucres

Les transporteurs de sucres sont des protéines qui permettent le passage actif des sucres à travers la membrane plasmique contre leur gradient de concentration. Généralement il s'agit de co-transporteurs H^+/sucres qui couplent le transport d'une molécule de sucre à celui d'un proton. Ce transport requiert un gradient électrochimique de part et d'autre de la membrane plasmique, qui est généré et entretenu par une pompe H^+/ATPase .

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

2.1. Identification

2.1.1. Les transporteurs de saccharose

Le saccharose étant la principale forme de molécule carbonée transportée chez de nombreuses espèces, son transport a alors fait l'objet de nombreuses études, et actuellement des résultats complets sont disponibles dans la littérature.

2.1.1.1. clonage

La première stratégie visant à isoler un ADNc de transporteur de saccharose a été basée sur la complémentation fonctionnelle de levures mutantes délétères pour l'invertase pariétale (YSH INV8, YSH SUSY7). A l'aide de cette méthode, Riesmeier *et al.* (1992), ont isolé à partir d'une banque d'ADNc de feuilles d'épinard, l'ADNc du premier transporteur de saccharose appelé *SoSUT1* (*Spinacea oleacera* Sucrose transporter 1). Cet ADNc code une protéine d'un poids moléculaire putatif de 55 kDa, dont le profil d'hydrophobicité indique la présence de 12 segments transmembranaires. L'étude des cinétiques d'absorption du saccharose par les levures complémentées avec *SoSUT1*, a montré que cette absorption est dépendante du pH avec un Km apparent de 1,5 mM. De plus, cette absorption est inhibée par le PCMBS (Acide *p*-chloromercuribenzoïque sulfonique), le DEPC (diethylpyrocarbonate), la NEM (N-éthylmaléimide) et le CCCP (Cyanure de carbonyle-m-chlorophénylhydrazone) ; ce qui est en accord avec les données préalablement obtenues *in planta*. En utilisant la même stratégie, cette équipe a ensuite isolé l'ADNc codant un transporteur de saccharose des feuilles de la pomme de terre (*StSUT1* : *Solanum tuberosum* Sucrose Transporter 1 ; Riesmeier *et al.*, 1993). .

Par la suite les transporteurs de saccharose ont plutôt été isolés par criblage de banque d'ADNc, au moyen de sondes moléculaires hétérologues. C'est ainsi que les premiers ADNc de transporteurs de saccharose d'*Arabidopsis thaliana* ont été identifiés avec l'ADNc *SoSUT1* comme sonde hétérologue (*AtSUT1* et *AtSUT2* : *Arabidopsis thaliana* Sucrose Transporter 1 et 2 ; Sauer et Stolz, 1994). De même, *PmSUT1* (*Plantago major* Sucrose transporter 1) a été isolé par criblage d'une banque d'ADNc de tissus conducteurs de *Plantago major* avec l'ADNc *AtSUT1* (Gahrtz *et al.*, 1994).

L'accroissement du nombre de séquences nucléotidiques disponibles a ensuite permis de cribler les banques d'ADNc au moyen de sondes homologues, obtenues par RT-PCR avec des oligonucléotides dégénérés, dessinés dans les régions hautement conservées. Ce fût le cas pour le clonage de *HvSUT1* et *HvSUT2* (*Hordeum vulgare* Sucrose Transporter 1 et 2 ;

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

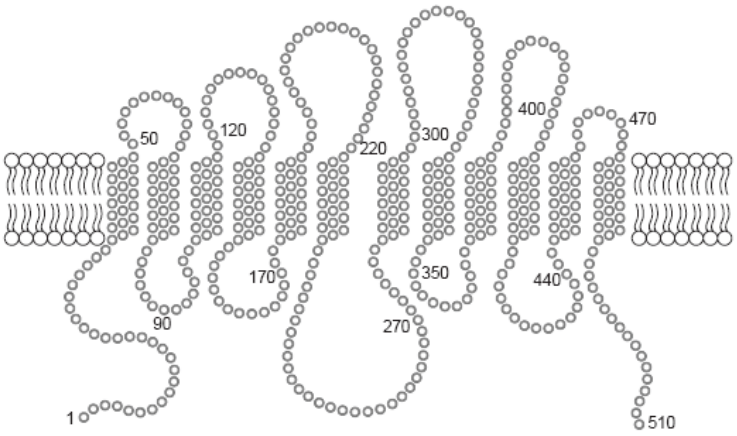


Figure 26 : Structure secondaire des transporteurs de saccharose.
Représentation schématique de la structure secondaire de PmSUC2 (*Plantago major* Sucrose Carrier 2)

d'après Williams *et al*., 2000

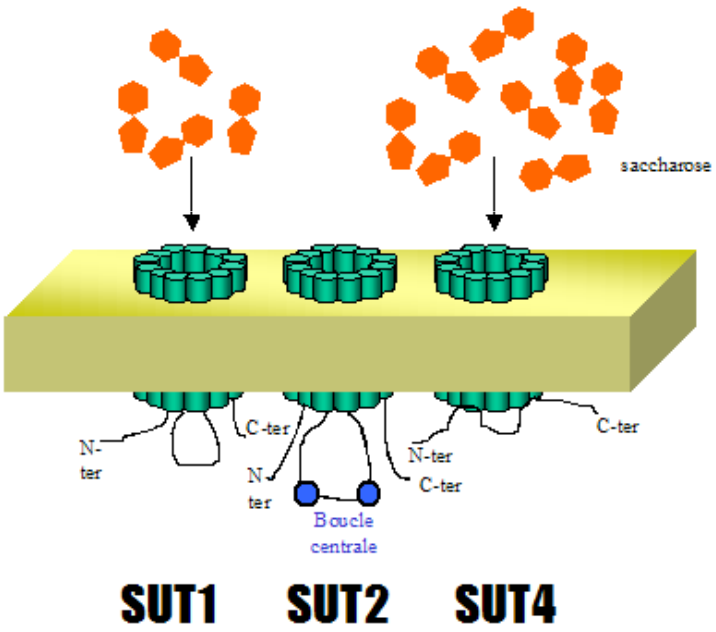


Figure 27: Schéma des structures des trois types de transporteurs de saccharose

Représentation de la structure à 12 segments transmembranaires des transporteurs de saccharose, et de la spécificité de chacun des trois groupes.
SUT1 : transporteurs à haute affinité
SUT2 : transporteurs de type senseur ?
SUT4 : transporteurs à faible affinité

N-term et C-term désignent les extrémités N et C terminales des protéines

Weschke *et al.*, 2000). Cette technique s'est ensuite généralisée et a permis de cloner de nombreux autres ADNc codant des transporteurs de saccharose. Il existe quelques exemples, pour lesquels un procédé de clonage différent a été utilisé : *AbSUT1* et *AmSUT1* (*Asarina barclaina* Sucrose transporter 1 et *Alonsoa meridionalis* Sucrose transporter 1) ont été identifiés par la technique de RACE-PCR (Rapid amplification of cDNA-ends by polymerase chain reaction, Knop *et* al., 2001) ; et *StSUT4* (*Solanum tuberosum* Sucrose transporter 4) par RT-PCR au moyen d'oligonucléotides définis à partir de la séquence du gène orthologue *LeSUT4* (*Lycopersicon esculentum* Sucrose Transporteur 4 ; Weise *et al.*, 2000).

2.1.1.2. Caractéristiques

Tous les transporteurs de saccharose clonés jusqu'à présent présentent des caractéristiques communes. Tout d'abord, ils appartiennent tous à des familles multigéniques : neuf transporteurs de saccharose sont connus chez *Arabidopsis thaliana*, (Sauer, 2007), trois chez le tabac (Lemoine *et al.*, 1999 ; Burkle *et al.*, 1998 ; Ward *et al.*, 1998), quatre chez la vigne (Davies *et al.*, 1999 ; Ageorges *et al.*, 2000), et trois chez le grand plantain, (Sauer, 2007). Ils appartiennent tous à la famille des MFS (Major Facilitative Superfamily ; Marger et Saier, 1993) et possèdent tous 12 segments transmembranaires (figure 26). Leur masse moléculaire (MM) prédite avoisine les 54 kDa et leur point isoélectrique (pI) est proche de 9, sauf pour les transporteurs de saccharose de type SUT2 (MM d'environ 64 kDa et pI de 6). Enfin, des expériences de compétition réalisées dans un système hétérologue levure, ont permis de montrer que la plupart des transporteurs de saccharose étaient très spécifiques de leur substrat. Effectivement, seuls le saccharose, le maltose et le raffinose sont capables de réduire l'absorption de saccharose radiomarqué (Lemoine, 2000). De plus, la capacité des transporteurs de saccharose à prendre en charge la vitamine H (biotine) a également été démontrée (Ludwig *et al.*, 2000).

Malgré tous ces critères communs, les transporteurs de saccharose sont généralement classés en trois groupes.

- Les transporteurs de type SUT1 (figure 27) :

Ce sont les transporteurs de saccharose dits « classiques » à faible capacité mais forte affinité, dont le Km est inférieur à 3 mM. Plusieurs isoformes de cette catégorie coexistent chez une même espèce (sept chez Arabidopsis), avec des profils d'expression différents. Par exemple, *AtSUC9* est exprimé partout dans la plante (Sivitz *et al.*, 2007) ; d'autres gènes sont spécifiques des organes sources, comme *StSUT1* retrouvé dans les feuilles de pomme de terre

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

(Riesmeier *et al.*, 1993) ou des organes puits, tels *AtSUC5*, spécifique de l'endosperme (Baud *et al*., 2005), ou encore *JrSUT1* (*Juglans regia* Sucrose transporter 1) spécifique du parenchyme xylémien (Decourteix *et al.*, 2006). Le rôle physiologique de tous ces transporteurs est plus ou moins défini selon les isoformes. Par exemple *AtSUC5* jouerait un rôle dans le développement précoce de la graine lors de l'accumulation des réserves, où il contrôlerait la concentration en saccharose extracellulaire. *AtSUC9*, aurait une fonction majeure dans la floraison, il permettrait d'éviter une floraison trop précoce en maintenant une concentration extracellulaire en saccharose faible (Sivitz *et al.*, 2007). Enfin, *JrSUT1* pourrait permettre aux cellules associées aux vaisseaux (CAVs) de récupérer le saccharose perdu dans les vaisseaux après le dégel (Decourteix *et al.*, 2006).

- Les transporteurs de type SUT4 (figure 27) :

Il s'agit de transporteurs de saccharose à faible affinité et forte capacité. Leur Km est généralement supérieur à 5 mM avec un maximum à 11,6 mM pour *AtSUT4* (*Arabidospis thaliana* Sucrose transporter 4). Cette catégorie ne présente que 47% d'homologie avec le groupe SUT1. La plupart des espèces ne possède qu'une isoforme de ce type par exemple : *StSUT4* (*Solanum tuberosum* Sucrose Transporter 4 ; Weise *et al*., 2000) ou *AtSUT4* (Weise *et al*., 2000) ; mais chez certaines espèces, on peut trouver plusieurs isoformes de *SUT4* comme chez l'orge *Hordeum vulgare* (*HvSUT1* et *HvSUT2*, Weshcke *et al*., 2000). Chez *Arabidopsis*, *AtSUT4* est exprimé dans les fines nervures des feuilles, où un transport à forte capacité du saccharose est nécessaire pour le chargement du phloème (Weise *et al*., 2000). Chez la tomate et la pomme de terre, *SUT4* a été mis en évidence dans les tubes criblés. Il pourrait participer à la réabsorption de saccharose perdu dans l'apoplaste lors du transport à longue distance de ce dernier (Weise *et al.*, 2000).

- Les transporteurs de type SUT2 (figure 27) :

Ce groupe a été mis en évidence par comparaison des séquences (génomique et ADNc) de tous les transporteurs d'*Arabidopsis thaliana*, *AtSUT2* s'est alors révélé être très différent de tous les autres transporteurs de saccharose. En effet, celui-ci présente 13 introns (contre 2 à 4 pour les autres SUTs d'*Arabidopsis*), une masse moléculaire protéique plus élevée (extension en C-terminal et une boucle centrale plus longue, figure 12B) et un léger biais de codon, le même que celui du senseur d'acides aminés de la levure (Iraqui *et al.*,1999). Aujourd'hui, leur fonction exacte n'est pas encore définie ou semble dépendre de l'espèce. Les premiers résultats obtenus sur ces transporteurs ont conduit à émettre l'hypothèse selon laquelle ces transporteurs de type SUT2 seraient des senseurs du saccharose. En effet, l'ADNc *AtSUT2* ne complémente pas les levures mutantes pour le transport de saccharose SUSY7/ura3

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

(Riesmeier *et al.*, 1992), et sa protéine présente une extension C-terminale comme les protéines senseurs de la levure de boulanger (Snf3p et Rgt2p ; Özcan *et al*, 1996). Les mêmes résultats ont été obtenus avec le transporteur de type SUT2 de la tomate, *LeSUT2* (Barker *et al.*, 2000). Cependant, des résultats contradictoires ont été plus récemment obtenus pour le gène *PmSUC3* (*Plantago major* Sucrose Carrier 3), orthologue de *AtSUT2* chez le plantain (Barth *et al*., 2003). Cet ADNc confère une capacité d'absorption du saccharose et du maltose aux levures mutantes, avec un Km de 5,5 mM, et est exprimé dans les complexes cellules compagnes/tubes criblés de *Plantago major* (Barth *et al*., 2003).

2.1.2. Les transporteurs d'hexoses

Au niveau des organes puits, lors du déchargement du phloème, le sucre peut-être directement transporté sous forme de saccharose, ou alors hydrolysé en glucose et fructose par l'invertase pariétale, lesquels sont ensuite transportés. Dans ce dernier cas, ce sont des transporteurs d'hexoses qui prennent en charge les sucres. Ce sont également des co-transporteurs H^+/Hexoses.

2.1.2.1. Clonage

Afin d'isoler le premier ADNc codant un transporteur d'hexoses, une approche génétique basée sur le criblage différentiel d'une banque d'ADNc a été utilisée chez *Chlorella kessleri* (Sauer et Tanner, 1989). Ces auteurs ont ainsi pu cloner *CkHUP1* (*Chlorella kessleri* Hexose Uptaker 1), un ADNc codant une protéine de 57 kDa. La fonctionnalité de la protéine correspondante a été démontrée ultérieurement: CkHUP1 est capable d'absorber le glucose avec une forte affinité en système hétérologue (environ 15 µM, Sauer *et al*., 1990). D'après le profil d'hydrophobicité prédit, cette protéine possède 12 segments transmembranaires.
Cependant, des différences observées entre les résultats en système hétérologue et *in vivo*, notamment la faible absorption de galactose par *CkHUP1*, ont conduit d'autres auteurs à rechercher d'autres transporteurs d'hexoses chez la chlorelle. Ainsi le criblage d'une banque d'ADNc de *Chlorella kessleri* a été réalisé avec *CkHUP1* comme sonde homologue et a conduit à l'isolation d'un second ADNc de transporteur d'hexoses : *CkHUP2* (*Chlorella kessleri* Hexose Uptaker 2 ; Stadler *et al.*, 1995). Enfin en utilisant la technique de RT-PCR, la même équipe a pu identifier un troisième transporteur d'hexoses chez la chlorelle : *CkHUP3*.

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

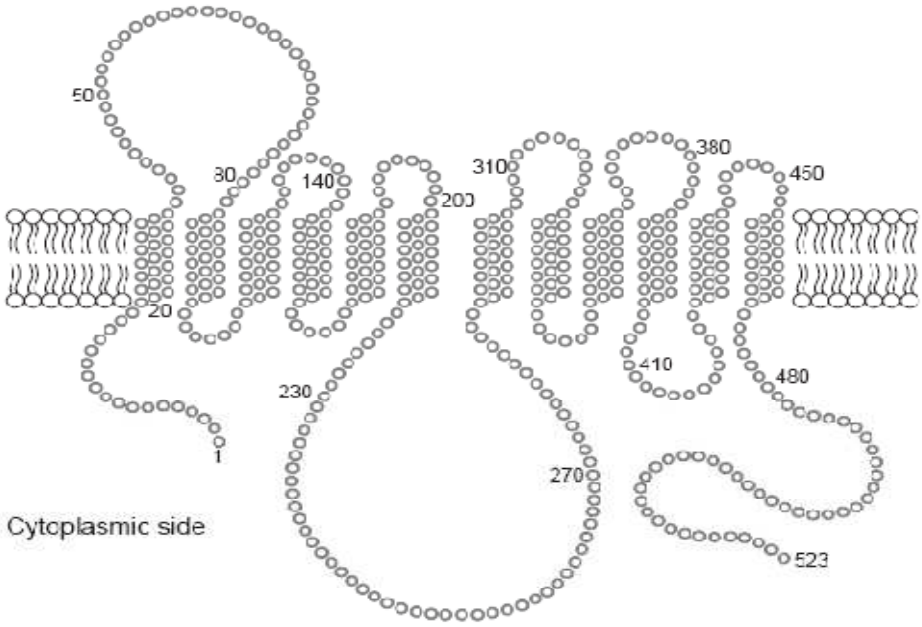


Figure 28 : Structure Secondaire des transporteurs d'hexoses
Représentation schématique de la structure secondaire du transporteur d'hexoses NtMST1 (*Nicotiana tabacum* Monosaccharide Transporter 1).

d'après Williams *et al.*, 2000

L'étape suivante a été le clonage d'ADNc de transporteur d'hexoses chez les embryophytes. Pour ce faire, l'ADNc de *CkHUP1*, a été utilisé comme sonde moléculaire hétérologue contre une banque d'ADNc d'*Arabidopsis thaliana*. Ceci a conduit à l'identification de *AtSTP1* (*Arabidopsis thaliana* Sugar Transporter 1 ; Sauer *et al.*, 1990). Plus tard, une importante famille de transporteurs d'hexoses a été décrite chez le ricin (Weig *et al.*, 1994). Depuis, de nombreuses séquences codant des transporteurs de monosaccharides ont été obtenues chez de nombreuses espèces végétales, soit par criblage hétérologue (*AtSTP4*, Trüernit *et al.*, 1996 ; *AtSTP2*, Trüernit *et al.*, 1999) ou homologue (*Mtst1*, Harrison, 1996 ; *Vvht1*, Fillion *et al.*, 1999) de banques d'ADNc ; soit par des approches basées sur les techniques de PCR sur banque d'ADNc (*AtSTP6*, Scholz-Starke et Sauer, 2003) ou de RT-PCR (*AtSTP2*, Trüernit *et al.*, 1999 ; *AtSTP9*, Schneidereit *et al.*, 2003 ; *OsMST6*, Wang *et al.*, 2008). Enfin, grâce aux efforts de séquençage complet de différents génomes, ces premiers résultats ont pu être complétés. Par exemple 14 paralogues (gènes issus de la duplication d'un gène ancestral au sein d'un génome, différenciés par l'accumulation de mutations postérieures fortuites) de transporteurs d'hexoses existent chez *Arabidopsis thaliana*, mais leur fonctionnalité respective n'a pas encore été démontrée (Büttner, 2007).

2.1.2.2. Caractéristiques

Tous les transporteurs de monosaccharides végétaux possèdent 12 segments transmembranaires (figure 28) ainsi que deux domaines peptidiques conservés : **PESPRXL** à l'extrémité du 6ème segment transmembranaire et **PETKGXXXE** à l'extrémité du 12ème. Les autres caractéristiques sont plus variables chez les transporteurs d'hexoses. La majorité de ces transporteurs ont une masse moléculaire théorique comprise entre 55 et 58 kDa et un point isoélectrique théorique compris entre 6 et 10. Concernant leur spécificité, elle est généralement faible, c'est-à-dire que les transporteurs de monosaccharides sont généralement peu spécifiques d'un substrat en particulier, à l'exception de *AtSTP9* (*Arabidopsis thaliana* Sugar Transporter 9) qui est très spécifique du glucose (Schneidereit *et al.*, 2003).

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

2.2. Expression et localisation

2.2.1. Expression

- Les transporteurs de saccharose :

L'expression de ces transporteurs est souvent observée dans de nombreux organes avec en général une expression préférentielle dans un ou deux organes. Certains transporteurs présentent une forte expression dans les tissus sources comme *StSUT1* (Riesmeier *et al.*, 1993), *NtSUT1* (Bürckle *et al*., 1998), *LeSUT1* (Barker *et al*., 2000) ou *AgSUT1* (Noiraud *et al*., 2000). D'autres montrent une expression spécifique dans des organes puits comme *AtSUT4* (Weise *et al.*, 2000), *NtSUT3* (Lemoine *et al.*, 1999), *JrSUT1* (Decourteix *et al.*, 2006) ou encore *DcSUT2* (Shakya et Sturm, 1998). D'autres transporteurs de saccharose ont été principalement retrouvés dans le complexe conducteur du phloème, à l'instar de *StSUT1* qui est exprimé dans le phloème des feuilles matures et des racines (Riesmeier *et al.*, 1993). Des études plus précises ont mis en évidence que les transporteurs de saccharose pouvaient être détectés dans les cellules compagnes ou dans les tubes criblés du complexe conducteur. Chez la tomate, *LeSUT1*, *LeSUT2* (Barker *et al.*, 2000) et *LeSUT4* (Weise *et al.*, 2000) sont transcrits dans les tubes criblés ; alors que chez Arabidopsis, *AtSUC1*, *AtSUT2* et *AtSUC4* sont exprimés dans les cellules compagnes (Schulze *et al.*, 2003) ; il en est de même pour *PmSUC2* (*Plantago major* Sucrose Carrier 1 ; Stadler *et al.*, 1995) et *BvSUT1* (*Beta vulgaris* Sucrose transporter 1 ; Vaughn *et al.*, 2002).

- Les transporteurs d'hexoses :

Jusqu'à présent, seuls deux transporteurs d'hexoses ont été détectés comme spécifiques d'un tissu source : il s'agit de *AtSTP1* et *AtSTP3* qui sont retrouvés uniquement dans la feuille (Stadler *et al.*, 2003 ; Büttner, 2000). Les autres transporteurs sont soit exprimés dans les tissus sources et puits comme *LeHT2* (*Lycopersicon esculentum* Hexose Transporter ; Gear *et al*., 2000), *OsMST6* (Wang *et al*., 2008), et *VvHT3*, *VvHT4*, *VvHT5* (Hayes *et al*., 2007) ; soit exprimés exclusivement dans les tissus puits, tels *AtSTP4* (Trüernit *et al.*, 1996), *AtSTP11*, exprimé dans le tube pollinique (Schneidereit *et al.*, 2005), ou *AtSTP13*, retrouvé dans les tissus vasculaires des pétales (Norholm *et al.*, 2006).

2.2.2. Localisation

Les transporteurs de saccharose sont en majeure partie localisés sur la membrane plasmique des cellules (Lemoine, 2000 ; Sauer, 2007). Cependant, quelques transporteurs ont

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

pu être identifiés au niveau de la membrane vacuolaire. Une étude protéomique du tonoplaste de l'orge a permis de mettre en évidence la localisation vacuolaire du transporteur *HvSUT2* (Weschke *et al.*, 2000 ; Endler *et al.*, 2006). L'analyse de l'expression transitoire de la fusion *HvSUT2* :: GFP a confirmé ce résultat (Endler *et al.*, 2006). Les mêmes conclusions ont été obtenues pour *AtSUC4*, homologue de *HvSUT2* chez *Arabidopsis* (Endler *et al.*, 2006) ou encore pour *LjSUT4* (*Lotus japonicus* Sucrose Transporter 4) chez le lotier (Reinders *et al.*, 2008). Il a donc été proposé que la localisation vacuolaire devait être une propriété commune à tous les transporteurs de saccharose du sous-groupe de *HvSUT2* (groupe IV ; Sauer, 2007).

Les transporteurs d'hexoses peuvent être localisés au niveau des différentes membranes cellulaires. La plupart de ces transporteurs sont retrouvés au niveau de la membrane plasmique comme les *AtSTPs* d'*Arabidopsis* (Büttner, 2007) mais d'autres isoformes plus particulières, sont également retrouvées sur la membrane vacuolaire (PcHXT : putatif *Pyrus communis*, Shiratake *et al.*, 1997) et AtVGT1, AtVGT2 (*Arabidopsis thaliana* Vacuolar Glucose Transporter 1 et 2 , Aluri et Büttner, 2007) ou sur la membrane plastidiale (pGlcT, Plastidic Glucose Transporter chez l'épinard, Weber *et al.*, 2000).

2.3. Fonctions

Les transporteurs de sucres assurent de très nombreuses fonctions et interviennent dans divers processus physiologiques (Williams *et al.*, 2000 ; Lemoine, 2000 ; Sauer, 2007). Ces fonctions vont dépendre du site d'expression des transporteurs et donc de chaque isoforme.

Tout d'abord, les isoformes qui sont exprimées dans les organes sources, sont généralement localisées au niveau du phloème. Ces transporteurs de saccharose sont indispensables au chargement du phloème, au maintien du flux phloémien et à la réabsorption du saccharose perdu dans l'apoplaste (Sauer, 2007). Le rôle essentiel de certain de ces transporteurs a été démontré, comme par exemple *STP13* (Sugar Transporter 13), exprimé dans les feuilles. Il jouerait un rôle essentiel dans la croissance des plantes (Schofield *et al.*, 2009).

Au niveau des organes puits, les transporteurs de sucres assurent diverses fonctions. Ils permettent l'absorption des sucres libérés dans l'apoplaste, soit directement sous forme de saccharose, soit sous forme d'hexoses après hydrolyse par une invertase pariétale. Il semblerait que les transporteurs d'hexoses soient privilégiés lors des périodes de croissance cellulaire intense, alors que les transporteurs de saccharose sont retrouvés dans les organes puits en période de stockage (Sauer, 2007). Le développement de la graine de fève est une

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

illustration de cette hypothèse. Durant ce processus un transporteur d'hexoses, *VfSTP1* (*Vicia faba* Sugar Transporter 1) et un transporteur de saccharose, *VfSUT1 1* (*Vicia faba* Sucrose Transporter 1), sont exprimés dans l'épiderme de l'embryon mais à des stades différents du développement (Weber *et al*., 1997). *VfSTP1*, ainsi qu'une invertase pariétale, sont détectés lors de la phase précédant la mise en réserve (activité mitotique intense) alors que *VfSUT1* est exprimé lors de la phase de mise en réserve. D'autres rôles sont assignés aux transporteurs de sucres au niveau des organes puits, comme par exemple le contrôle de la déhiscence des anthères chez *Arabidopsis* (*AtSUC1*, Stadler *et al.*, 1999) ; le transfert des sucres des vaisseaux du xylème aux cellules du parenchyme pendant l'hiver (*JrSUT1*, Decourteix *et al.*, 2006) ; ou encore la sortie du saccharose des tubes criblés et son import dans les fruits en développement (*LeSUT2*, Hackel *et al.*, 2006). Quant au rôle des transporteurs de saccharose de type SUT4, plusieurs questions restent à résoudre. Les transporteurs de type SUT4 avaient d'abord été localisés au niveau de la membrane plasmique des tubes criblés (*LeSUT4*, *StSUT4* ; Weise *et al.*, 2000) ou dans les nervures mineures des feuilles (*AtSUT4*, Weise *et al.*, 2000), et leur rôle proposé était d'assurer le chargement du phloème. La mise en évidence récente de la localisation tonoplastique des transporteurs *HvSUT2* et *AtSUT4* (Endler *et al.*, 2006) impliquerait un rôle dans les échanges en saccharose entre le cytoplasme et la vacuole.

2.4. Régulation

Cette régulation est sous le contrôle des facteurs environnementaux, des contraintes biotiques et abiotiques et de l'état de développement de la plante. De plus elle peut avoir lieu aux niveaux transcriptionnel, post-transcriptionnel, traductionnel et/ou post-traductionnel (Sakr *et al.*, 1997 ; Sauer, 2007).

2.4.1. Transcriptionnelle et post-transcriptionnelle

Ces types de régulation permettent la modulation de la quantité globale de transcrits en réponse à différents facteurs. Elles vont intervenir au niveau de l'activité de transcription ainsi qu'au niveau de l'équilibre stabilité/dégradation (turnover) des ARNm transcrits.

2.4.1.1. Les promoteurs

Un certain nombre de promoteurs de transporteurs de sucres a été isolé jusqu'à présent, mais la plupart n'ont pas été caractérisés. Ils ont été utilisés pour des constructions

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

fusionnelles de types [promoteur :: gène rapporteur], afin d'étudier la localisation des transporteurs. Nous trouvons par exemple les promoteurs de *AtSUC1* (Trüernit et Sauer, 1995), de *AtSUC2* (Juergensen *et al.*, 2003), de *AtSUT4* (Trüernit *et al*., 1996) ou encore de *AtSTP2* (Trüernit *et al.*, 1999), utilisés dans ce but de localisation. Toutefois, quelques promoteurs de transporteurs de sucres ont été plus finement étudiés, notamment celui de *cSUT* (carrot Sucrose Transporter) et *VvHT1* (*Vitis vinifera* Hexose transporter 1).

Concernant le promoteur du transporteur de saccharose *cSUT* , il a été mis en évidence que la transcription du gène *cSUT* pouvait être inhibée par le saccharose lui-même (Yang *et al.*, 2004). Le promoteur a donc été isolé et des expériences de gel-shift ont permis de mettre en évidence la région du promoteur reconnue par le facteur de transcription responsable de cette répression par le saccharose. C'est une région d'environ 100 pb située à –460 pb en amont de l'ATG. Des analyses bioinformatiques, menées par la suite, ont permis de détecter la présence dans cette région du promoteur d'une « boîte amylase » et d'un élément de régulation par les gibbérellines et par les sucres de l'expression de l'α-amylase du riz (Yang *et al.*, 2004).

Le promoteur du transporteur d'hexoses de la vigne *VvHt1* a aussi été étudié en détails (Fillion *et al.*, 1999). Ce promoteur est responsable de la régulation spatiale de la transcription de *VvHt1*, qui est exprimé spécifiquement dans les organes puits (Fillion *et al.*, 1999). Ce résultat a été confirmé par l'étude de la fusion promoteur :: gène rapporteur GUS (Atanassova *et al.*, 2003). Ce promoteur est également responsable de l'induction de l'expression de *VvHT1* par le glucose, le saccharose, la kinétine, l'ABA et des analogues de glucides : palatinose, mélibiose et turanose (Leterrier, 2003 ; Atanassova *et al.*, 2003). De plus, son activité est régulée par une protéine de type ASR (ABA-, Stress-, Ripening- induced) capable de se fixer sur la région proximale du promoteur contenant deux couples d'éléments cis-régulateur de réponse aux glucides : le couple sucrose box3 et SURE1 (Sucrose Responsive Element [AATAGAAAA] ; Cakir *et al.*, 2003).

Récemment, il a été montré que d'autres éléments que le promoteur pouvaient intervenir dans la régulation transcriptionnelle des transporteurs de sucre, comme les introns qui seraient responsable de la régulation transcriptionnelle tissulaire de *LeSUT1* (Weise *et al.*, 2008).

2.4.1.2. Régulation au cours du développement

Il a été montré qu'au cours du développement, l'expression de certains transporteurs de sucres pouvait varier. Le meilleur exemple reste le passage de l'état puits à l'état source de

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

la feuille, impliquant une régulation transcriptionnelle des transporteurs de sucres. C'est le cas pour *StSUT1* qui jouerait un rôle dans le chargement en saccharose du phloème dans la feuille de pomme de terre. En effet, l'expression de ce gène augmente lors de la transition feuilles puits/feuilles sources (Riesmeier *et al.*, 1993). En revanche, l'expression du transporteur d'hexoses *NtMST1* est réprimée lors de ce processus dans la feuille de tabac (Sauer et Stadler, 1993). Chez *Arabidopsis*, *SPF1* (sugar-porter family protein 1) est induit lors de la sénescence des feuilles (Quirino *et al.*, 2001).

Un autre processus illustrant une fine régulation des transporteurs d'hexoses, est le développement du grain de pollen chez *Arabidopsis thaliana*. Ce phénomène a été très étudié et il en ressort que cinq des 14 transporteurs d'hexoses sont exprimés à des stades très précis du développement du pollen. *ATSTP2* s'exprime uniquement lors des stades précoces (Trüernit *et al.*, 1999). *AtSTP4* est détecté uniquement au niveau de la membrane plasmique du tube pollinique alors qu'il en est absent avant la germination (Trüernit *et al.*, 1999). L'expression de *AtSTP6* débute dans les grains de pollen aux stades 11 et 12 de la fleur, avant l'ouverture des bourgeons floraux (Scholz-Starke et Sauer, 2003). *AtSTP9* est exprimé depuis le stade 10 de la fleur jusqu'à la germination du pollen (Schneidereit *et al.*, 2003) et enfin, *AtSTP11* est exprimé pendant la germination et uniquement dans le tube pollinique (Schneidereit *et al.*, 2005).

2.4.1.3. Régulation par les facteurs environnementaux

Le premier facteur environnemental connu pour réguler les transporteurs de sucres est la lumière. Celle-ci pourrait agir directement *via* des photorécepteurs spécifiques ou indirectement en modifiant le statut carboné de la plante. Plusieurs exemples sont décrits dans la littérature. Chez le riz, la lumière induit l'expression de *OsSUT1* (*Oriza sativa* Sucrose transporter 1) dans les jeunes embryons (Matsukura *et al*., 2000). Au stade plantule, les transcrits de *OsSUT1* sont plus abondants dans des plantules étiolées que dans des plantules cultivées à la lumière (Hirose *et al.*, 1997). D'autres études ont montré que certains gènes étaient régulés cycliquement par la lumière. La quantité de transcrits de *LeSUT1* (*Lycopersicon esculentum* Sucrose Transporter 1) augmente à la lumière et diminue à l'obscurité (Kühn *et al.*, 1997). De même chez la carotte, la quantité de transcrits de *DcSUT1* (*Daucus carota* Sucrose Transporter 1) augmente elle aussi pendant les phases diurnes (Shakya et Sturm, 1998). Il a été montré que certains transporteurs de saccharose étaient régulés par le rythme circadien. C'est le cas de *StSUT4*, dont la quantité de transcrits oscille cycliquement en lumière continue et dont le promoteur présente des boîtes putatives de

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

régulation par le rythme circadien (Chincinska *et al.*, 2008). Il existe aussi quelques données sur ce type de régulation pour les transporteurs d'hexoses. Par exemple la quantité de transcrits d'*AtSTP1* dans les cellules de garde d'*Arabidopsis*, augmente fortement à la lumière (Stadler *et al.*, 2003).

2.4.1.4. Régulation hormonale

Il est connu depuis longtemps que les hormones régulent l'activité des transporteurs de sucres (Saftner et Wyse, 1984 ; Sauer, 2007). Toutefois, peu de données sont aujourd'hui disponibles sur les mécanismes précis de cette régulation au niveau moléculaire. Par exemple, les cytokinines augmentent la quantité de transcrits de *AtSUT1* dans des feuilles isolées d'*Arabidopsis* (Harms *et al.*, 1994), d'un transporteur d'hexose dans des cultures cellulaires de *Chenopodium rubrum* (Ehness et Roitsch, 1997) ou encore de *VvHXT1* chez la vigne (Delrot *et al.*, 2000). Il a également été montré que l'acide abscissique (ABA) pouvait réguler la quantité de transcrits de transporteur de saccharose chez la betterave (Saftner e Wyse, 1984). Une étude récente a également mis en évidence une activation de la transcription du transporteur de saccharose *StSUT4* par les gibbérellines et l'éthylène (Chincinska *et al.*, 2008).

2.4.2. Modifications post-traductionnelles

Cette régulation concerne toutes les modifications des protéines de transporteurs de sucres et qui ont pour but de moduler l'activité directe de ces protéines. La modification post-traductionnelle la mieux décrite pour les transporteurs de sucres végétaux est la phosphorylation.

2.4.2.1. Phosphorylation

C'est par l'étude des séquences peptidiques que des sites potentiels de phosphorylation ont pu être mis en évidence chez les transporteurs de sucres. Des études pharmacologiques, conduites sur des feuilles de betterave ont permis de montrer que l'infiltration d'acide okadaïque réduisait l'absorption du saccharose ; alors que la quantité membranaire de transporteurs restait constante (Roblin *et al.*, 1998). L'acide okadaïque étant un inhibiteur spécifique des phosphatases de type 2A, il semblerait que l'activité des transporteurs de saccharose soit régulée par phosphorylation/déphosphorylation et en l'occurrence inhibée par

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

son état de phosphorylation. Chez la betterave, l'activité du transporteur de saccharose est régulée par son taux de transcription, lui-même régulé par la concentration en saccharose (Vaughn *et al.*, 2002). Récemment, l'existence d'une cascade de phosphorylation protéique entre la perception de la concentration en saccharose et la régulation de la transcription de *BvSUT1* a été mise en évidence par des études pharmacologiques (Ransom-Hodgkins *et al.*, 2003).

2.4.2.2. Autres modifications post-traductionnelles

- La N-glycosylation :

Les séquences protéiques de certains transporteurs de saccharose possèdent des sites potentiels de N-glycosylation, comme l'asparagine en position 402 des *ATSUC* (Delrot *et al.*, 2000). Cependant, aucune étude n'a réellement démontré la glycosylation d'un transporteur de sucres.

- L'environnement lipidique :

Les études menées sur *CkHUP1* mettent en évidence que son interaction avec des ergostérols est importante pour le couplage énergétique (Opekarová *et al.*, 1994) et que son interaction avec la phosphatidylcholine est essentielle pour sa stabilité (Robl *et al.*, 2000).

- L'oligomérisation :

Récemment, une étude a mis en évidence la régulation de l'activité du transporteur *StSUT1* par son homodimérisation. En effet, les réactifs oxydatifs modifieraient l'équilibre monomère/dimère du transporteur en favorisant la forme dimère et ainsi sa localisation sur la membrane plasmique (Krügel *et al.*, 2008).

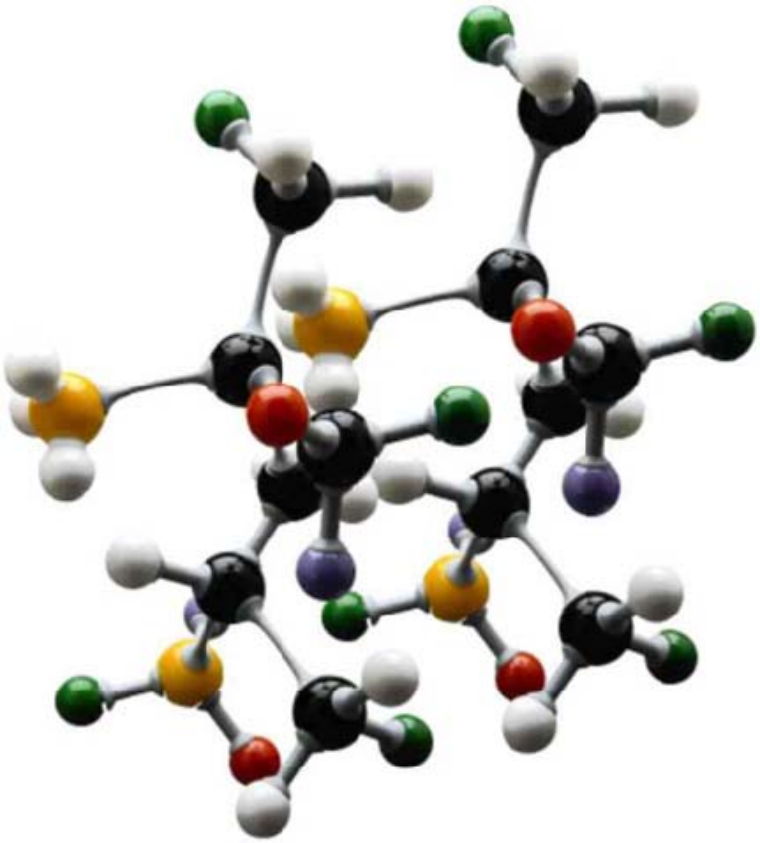
tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

Chapitre 3 :

Les polyols

et leurs transporteurs



tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

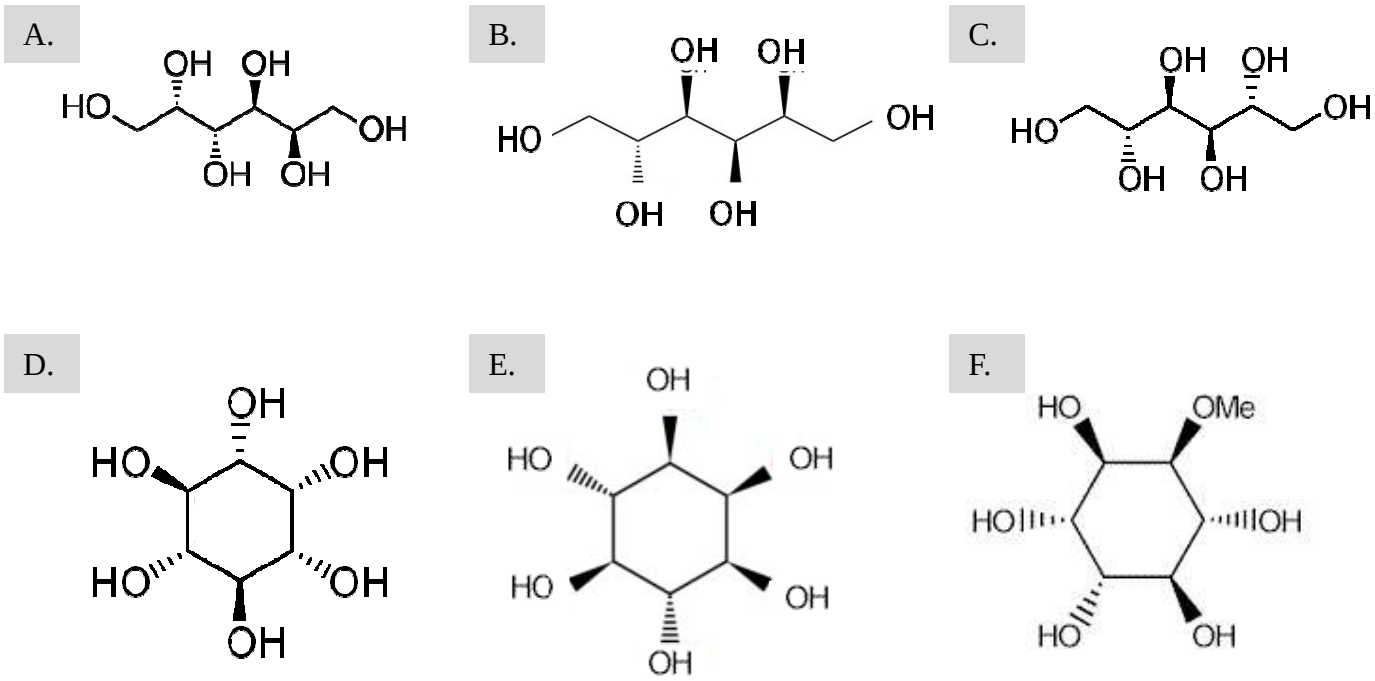


Figure 29 : Formules développées des principaux polyols végétaux

Les trois polyols aliphatiques les plus abondants chez les végétaux sont
(A) Le Galactitol
(B) Le Sorbitol
(C) Le Mannitol
Trois polyols cycliques sont aussi représentés
(D) L'Inositol
(E) Le *Myo*inositol
(F) Le Quebrachitol, polyol très abondant chez l'hévéa

1. Les polyols chez les végétaux

Chez certains embryophytes, le transport à longue distance du carbone réduit est assuré sous forme de saccharose et de polyols comme le mannitol et le sorbitol. Les polyols représentent donc une source importante de carbone pour ces végétaux. Ils sont eux aussi synthétisés au niveau des feuilles lors du processus de la photosynthèse et ensuite transportés à longue distance jusqu'aux organes puits.

1.1. Identification

Un polyol ou polyalcool ou glycol est un composé chimique organique caractérisé par un certain nombre de groupes hydroxyles (-OH). De formule chimique générale: $C_nH_{2n+2}O_n$, ils possèdent au moins deux groupements alcool. Les polyols sont considérés comme des dérivés d'oses et sont obtenus par la réduction du groupement aldéhyde ou cétone d'un glucide. Les polyols peuvent être classés en deux groupes :

- les alditols ou polyols aliphatiques qui ont une chaîne linéaire d'atomes de carbone et dérivent de l'hydrogénation d'oses simples.
- les cyclitols ou polyols cycliques qui sont des dérivés du cyclohexane.

Suivant la longueur de leur chaîne carbonée, les alditols sont désignés sous le nom de pentitols, hexitols, heptitols, etc. Les alditols les plus courants chez les plantes sont les hexitols (C6). Chaque aldose produit un seul alditol dont le nom dérive de cet ose, par exemple mannose donne le mannitol.

Il a été estimé qu'environ 30% de la production primaire de carbone sur terre passait par la synthèse de polyols chez les plantes et chez les algues (Bieleski, 1982). Chez les plantes supérieures, 17 alditols ont été identifiés dont 13 chez les angiospermes (Lewis, 1984). Les plus fréquemment rencontrés sont des polyols aliphatiques :

- le galactitol (ou dulcitol) : présent chez les Célastracées (fusain), les Scrofulariacées (muflier, digitale) et les Orobanchacées (orobanche).
- le sorbitol (figure 29) : principal produit photosynthétique chez plusieurs espèces de Rosacées ligneuses comme le pommier (*Malus*), le poirier (*Pyrus*), le prunier (*Prunus*).
- le mannitol (figure 29) : présent dans une centaine d'espèces de végétaux supérieurs appartenant aux familles des Rubiacées (caféier), des Oléacées (troène, frêne, olivier) et des Apiacées (céleri, carotte, persil).

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

En ce qui concerne les polyols cycliques, la forme majoritairement retrouvée est celle du cyclohexol le plus simple : l'inositol (figure 29). C'est un composant cellulaire ubiquiste retrouvé chez une large variété d'organismes, souvent sous sa forme liée. Le phosphatidylinositol est le 3ème phospholipide le plus abondant chez les eucaryotes (Duffy et Kane, 1996).

Chez l'hévéa, le quebrachitol (monomethyl l-inositol, figure 29) est le polyol majoritaire retrouvé dans le latex et les feuilles (de Jonge, 1906). Ce cyclitol peut atteindre 1% du latex (w/w) et représente le constituant soluble le plus abondant du latex (Bolle-Jones, 1955 ; d'Auzac et Pujarniscle, 1959, 1961 ; Low, 1978). Il est obtenu par méthylation du L-inositol, dérivé lui-même du *myo*inositol (figure 29).

1.2. Rôles

1.2.1. Les polyols aliphatiques

Chez les plantes, les rôles physiologiques proposés pour les alditols sont multiples : source de carbone, fournisseur d'énergie, intervention dans la tolérance aux stress abiotiques et biotiques.

Premièrement, à l'instar des sucres, les polyols aliphatiques servent de forme de transport et de stockage des molécules carbonées (Noiraud *et al.*, 2001b). Synthétisés également au niveau des organes sources (feuilles photosynthétiques), les polyols sont distribués à tous les organes puits hétérotrophes. Ils peuvent être soit directement utilisés comme fournisseurs de squelettes carbonés pour le métabolisme propre de l'organe puits, soit stockés pour une utilisation ultérieure (Noiraud *et al.*, 2001b).

Ensuite les alditols ont été identifiés comme molécules essentielles dans la tolérance aux stress biotiques et abiotiques et dans la réponse des plantes aux pathogènes (Stoop *et al.*, 1996 ; Hoekstra *et al.*, 2001). Ils jouent en effet les rôles capitaux d'osmorégulateurs, d'osmoprotecteurs et d'anti-oxydants. Beaucoup de stress environnementaux auxquels les plantes sont soumises semblent conduire à une diminution du potentiel hydrique. Un des moyens utilisés par des organismes tels que les champignons, les algues, les végétaux supérieurs pour tolérer ces stress est la synthèse et l'accumulation de composés solubles de faible poids moléculaire nécessaire à l'ajustement de leur potentiel hydrique. Ces composés sont appelés des solutés compatibles. Ils sont osmotiquement actifs et ils peuvent s'accumuler à de très hautes concentrations dans le cytosol sans pour autant interférer avec le métabolisme cellulaire. Parmi ces composés, on trouve le mannitol et le sorbitol.

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

La tolérance au stress salin du céleri (*Apium graveolens*), une plante qui transporte le mannitol, a été décrite dans la littérature. Cette espèce de la famille des Apiacées accumule et transporte effectivement du mannitol (Fellman *et al.*, 1987 ; Keller et Matile, 1989). 80% du mannitol est localisé dans la vacuole et 20% dans le cytosol, où le volume étant réduit, la concentration en mannitol est bien plus élevée (Keller et Matile, 1989). Plusieurs résultats tendent à prouver que le mannitol est un soluté compatible indispensable dans la résistance au stress salin du céleri. Au niveau physiologique, une accumulation du mannitol dans les feuilles de plantes irriguées avec une solution de NaCl (0,3 M) a été observée, suggérant un détournement du métabolisme cellulaire en faveur de la synthèse de mannitol (Everard *et al.*, 1994). Cette relation entre quantité de mannitol et résistance au stress salin, a été étayée par les résultats obtenus sur des cellules de culture de céleri. En effet, il a été montré que les cellules de céleri contenant du mannitol étaient deux fois plus résistantes au stress salin que celles contenant du saccharose (Pharr *et al.*, 1995). Le mannitol agit donc comme un réel osmoprotecteur. Cette hypothèse a ensuite été confirmée après surexpression de la Mannitol-1-phosphate-deshydrogénase (NAD dépendante) d'*Escherichia coli* chez des plantes ne synthétisant pas naturellement le mannitol, comme le tabac et *Arabidopsis*, (Tarczynski *et al*, 1992 ; Thomas *et al*., 1995). Les plantes transformées, produisant du mannitol, se sont alors révélées plus résistantes au stress salin que les plantes sauvages (Tarczynski *et al*, 1992 ; Thomas *et al*., 1995).

1.2.2. Les polyols cycliques

Les polyols cycliques peuvent également servir de forme de transport du carbone à longue distance. La plupart des données ne concernent que les hexitols cycliques, cependant quelques informations sont disponibles pour les autres polyols. Par exemple, le volemitol (7 carbones) a été détecté comme la principale forme de transport de carbone chez le genre *Primula* (Häfliger *et al.*, 1999). Ils peuvent également représenter une source d'énergie importante (Raboy, 2003).

D'autres rôles très spécifiques sont attribués aux polyols cycliques, le cas le plus abondamment décrit est celui de l'inositol et de ses dérivés, dont le principal est le *myo*inositol.

Le *myo*inositol et ses dérivés sont des molécules centrales pour de nombreuses voies métaboliques. Par exemple, le *myo*inositol est le précurseur de la biosynthèse de l'acide uridine diphosphoglucuronique (UDP-GLcUA) et l'acide galacturonique (GalUA) (Loewus

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

and Murthy, 2000 ; Kanter *et al.*, 2005). Il intervient également dans la biosynthèse du galactinol, du raffinose (Kandler et Hopf, 1984) et de l'acide ascorbique (Lorence *et al.*, 2004).

Ensuite le *myo*inositol assure la fonction de ligand. En effet, il est très fréquemment retrouvé sous sa forme liée. Il peut être par exemple conjugué à l'auxine et ainsi inhiber l'activité de celle-ci lors de son transport à longue distance (Cohen et Bandurski, 1982). Sous la forme de phospholipide, il joue un rôle structurant au niveau des membranes (Duffy et Kane, 1996).

Enfin, ces polyols cycliques et notamment l'inositol, souvent sous leur forme phosphatée, sont essentiels dans la transduction du signal cellulaire (Lehle, 1990)

1.2.3. Le Quebrachitol

Le Quebrachitol, molécule carbonée la plus abondante du latex, peut être un facteur déterminant du statut de turgescence des cellules laticifères. Cette pression de turgescence est essentielle pour l'écoulement du latex. Une forte accumulation de quebrachitol dans les cellules laticifères crée une force osmotique (au moins 30%, Low, 1978) qui impose un influx d'eau à partir des cellules adjacentes. La pression positive résultante influencerait la durée du flux de latex lors de la saignée. De plus, la fluidité du latex est augmentée, ce qui facilite son écoulement (Low, 1978). Chez l'hévéa, le quebrachitol jouerait donc un rôle non négligeable dans le rendement de production du latex. Le quebrachitol peut également participer au phénomène de coagulation du latex. En effet, sa forte concentration facilite l'éclatement des lutoïdes, remplis des enzymes responsables de la coagulation, et accélère ainsi ce processus (Low, 1978).

Outre ces fonctions, le quebrachitol pourrait être impliqué dans la biosynthèse du caoutchouc. Cette hypothèse repose sur la forte corrélation entre les espèces qui accumulent du quebrachitol et celles qui produisent du caoutchouc (Bealing, 1969). De plus, une inhibition de l'activité glycolytique induit une augmentation de la biosynthèse du caoutchouc, alors que la quantité de saccharose disponible augmente (Bealing, 1969). Cependant, ces études restent isolées et l'implication du quebrachitol dans la synthèse du caoutchouc n'est pas couramment admise.

1.3. Transport

Comme mentionné précédemment, les polyols peuvent être transportés à longue distance dans la plante (des organes sources aux organes puits) pour assurer l'approvisionnement en

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

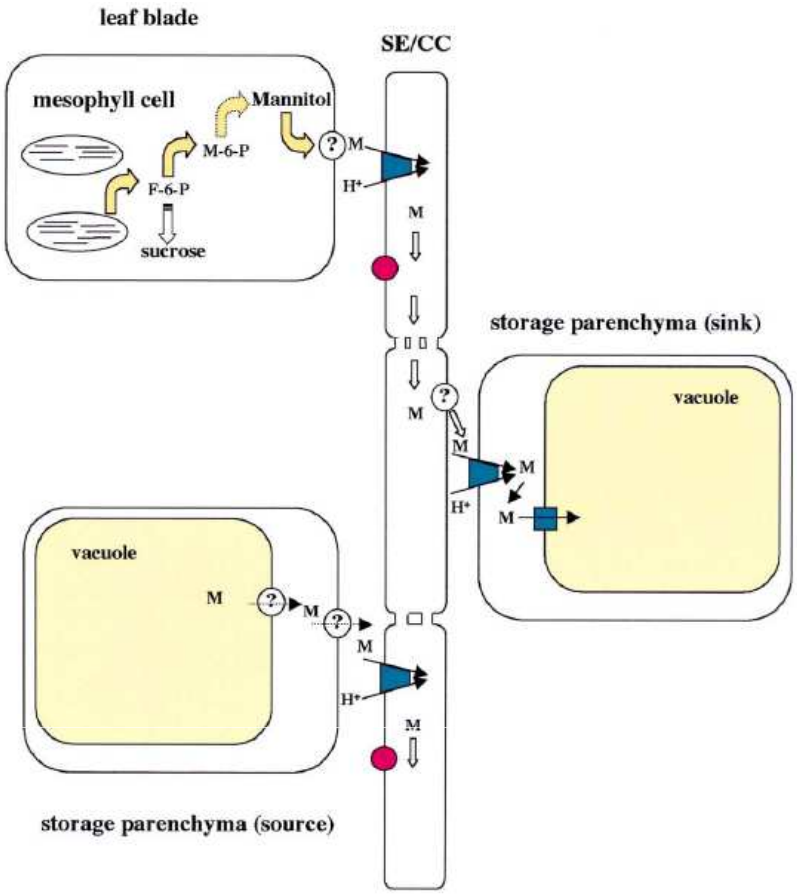


Figure 30 : Schéma hypothétique des chargement et déchargement des polyols du phloème

Ce schéma a été proposé dans les débuts de l'étude des transporteurs de polyols, en 2001 par Noiraud *et al.*
Il propose un mécanisme de chargement et déchargement du phloème pour le mannitol chez le céleri. Les deux se feraient par la voie apoplastique.
F6P : Fructose-6-Phosphate
G6P: Glucose-6-Phosphate
M : Mannitol

d'après Noiraud *et al.*, 2001a

carbone des organes hétérotrophes. A quelques exemples près, ce processus de transport n'a été étudié que pour les polyols aliphatiques. Nous allons donc développer ici le transport à longue distance des polyols aliphatiques et plus particulièrement sur celui du mannitol et du sorbitol (figure 30).

Le mannitol et le sorbitol sont des produits primaires issus de la photosynthèse, localisée dans les feuilles matures (Stoop *et al.*, 1996). Deux éléments viennent étayer l'hypothèse du transport à longue distance des polyols aliphatiques : i) aucune des enzymes de leur biosynthèse n'a été identifiée dans les organes puits, qui pourtant contiennent ces polyols (Davies *et al.*, 1982 ; Loescher *et al.*, 1992 ; Loescher et Everard, 1996) ; ii) la forte présence de polyols dans la sève phloèmienne (Zimmerman et Ziegler, 1978 ; Bieleski, 1982 ; Lewis, 1984). Par exemple chez le pêcher, le sorbitol atteint une concentration de 560 mM dans la sève phloémienne, et représente 60 à 90 % du carbone transporté (Moing *et al.*, 1997). Chez le céleri, le mannitol, à des concentrations pouvant atteindre 300 mM dans le phloème, peut représenter jusqu'à 60 % du transport carboné (Daie, 1986). Les polyols sont donc chargés dans le phloème, puis transportés par flux de masse dans celui-ci, et enfin déchargés au niveau des tissus puits.

Le mode du chargement des polyols dans le phloème a été pendant longtemps l'objet d'un désaccord scientifique. En effet, il avait d'abord été suggéré que ce chargement se faisait par la voie symplasmique (Flora et Madore, 1993). Chez le pêcher, l'absence de gradient de concentration du sorbitol (entre le phloème et les autres tissus) indiquait que le transport du sorbitol ne nécessitait pas d'énergie et qu'il pouvait donc se faire *via* les plasmodesmes (Moing *et al.*, 1997). Cette même constatation avait été faite chez le peuplier (Russin et Evert, 1985). Par la suite, les résultats de test d'infiltration du PCMBS (p-chloro-mercuribenzène, inhibiteur du chargement phloémien) chez le pêcher (Moing *et al.*, 1997), ou encore d'absorption de sorbitol radiomarqué dans les feuilles de *Prunus* (Bouché-Pillon, 1994), semblaient indiquer un chargement apoplastique du phloème. Les résultats contradictoires obtenus chez le céleri et le persil, ont montré que ces expériences ne pouvaient être généralisées pour décrire le chargement en polyols du phloème (Flora et Madore, 1996 ; Salmon *et al.*, 1995).

Récemment, et grâce aux premiers clonages des transporteurs de polyols chez le céleri (*Apium graveolens* Mannitol Transporter 1, Noiraud *et al.*, 2001a) et le plantin (*Plantago major* Polyols Transporter 1 et 2, Ramsperger-Gleixner *et al.*, 2004), le chargement apoplastique du phloème en polyols a pu être clairement montré chez certaines espèces.

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

En ce qui concerne le déchargement du phloème, peu de données sont aujourd'hui disponibles, mais il semblerait que celles-ci soient en faveur d'un déchargement apoplastique. Une activité de transport du sorbitol a été détectée dans les tissus de la pomme (Berüter, 1993 ; Berüter et Feusi, 1995) ainsi que dans les protoplastes isolés à partir de la pomme. De plus, les ADNc de transporteurs de sorbitol, ont été récemment clonés à partir d'une banque de tissus de fruit (*Prunus cerasus* Sorbitol Transporter 1 et 2, Gao *et al.*, 2003).

2. Les transporteurs de polyols

Les transporteurs de polyols sont des protéines qui permettent le passage de ces derniers à travers la membrane plasmique contre le gradient de concentration. Il s'agit d'un transport actif de type co-transporteur H^+/polyol, peu spécifique vis-à-vis d'un substrat et finement régulé.

Précédemment, nous avons identifié deux grandes classes de polyols : les polyols aliphatiques et les polyols cycliques. Il existe donc deux types de transporteurs de polyols selon la classe de polyols qu'ils prennent en charge. De surcroît, un nouveau type de transporteur de polyols vient d'être caractérisé : il s'agit de transporteurs de polyols présents chez des espèces qui ne transportent *a priori* pas les polyols, comme *AtPLT5* chez *Arabidopsis* (Arabidopsis thaliana Polyol Transporter 5).

2.1. Identification

2.1.1. Les transporteurs de polyols aliphatiques

Leur identification moléculaire reste récente et donc les informations les concernant limitées. Il s'agit de transporteur de mannitol chez les Apiacées et de transporteur de sorbitol chez les Rosacées ligneuses. Ils sont également présents dans d'autres familles comme les Plantaginacées (*Plantago major)*.

2.1.1.1. Clonage

Les premières expériences de clonages ont été conduites sur le céleri par Noiraud *et al.* (2001a). Comme aucune information n'était disponible sur les séquences des transporteurs de polyols, les auteurs ont supposé que ces transporteurs appartenaient à la famille des MFS (Major Facilitator Superfamily, Marger et Saier, 1993) comme les transporteurs de sucres ou de polyols cycliques (*myo*inositol) (Noiraud *et al*., 2001b). Un alignement des séquences

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

peptidiques de transporteurs de glucose, du transporteur de D-xylose de *Lactobacillus brevis*, de transporteurs d'arabinose et de galactose d'*Escherichia coli*, de transporteurs de *myo*inositol de levure, a permis de mettre en évidence une région hautement conservée : LLGFGVG. Cette séquence a été choisie pour dessiner un oligonuctéotide dégénéré, utilisé pour des expériences de 5' RACE-PCR sur des ARNm de phloème de pétiole de céleri. Le fragment de 1kb obtenu, a permis de cribler une banque d'ADNc de phloème de céleri. Sur les 22 clones positifs obtenus, 2 ont été choisis pour de plus amples analyses et un seul a conféré aux levures la capacité de pousser sur mannitol. Cet ADNc correspond donc au premier transporteur de polyol aliphatique cloné, il s'agit de *AgMAT1* (Noiraud *et al.*, 2001a). Par la suite, la même stratégie a été développée pour cloner les premiers transporteurs de sorbitol d'organes puits (Gao *et al.*, 2003). En réalisant une RT-PCR à l'aide d'amorces dégénérées sur des ADNc de fruits matures, ces auteurs ont pu identifier un fragment d'ADNc de 820 pb homologue à *AgMAT1*. Ce fragment d'ADNc a servi de sonde homologue pour le criblage de la même banque d'ADNc. Deux transporteurs de sorbitol ont alors pu être clonés chez le cerisier : *PcSOT1* et *PcSOT2* (*Prunus cerasus* Sorbitol transporter 1 et 2 ; Gao *et al.*, 2003).

Tous les clonages de transporteurs de polyols aliphatiques réalisés ultérieurement, ont été faits soit par RT-PCR grâce à des amorces dessinées à partir de *AgMAT1*, soit par criblage de banque d'ADNc à l'aide de la sonde hétérologue *AgMAT1*. Par exemple, une banque d'ADNc de tissus vasculaires de grand plantain a été criblée dans des conditions de faible stringence avec la sonde hétérologue *AgMAT1*, permettant le clonage de deux nouveaux gènes de transporteurs de polyols *PmPLT1* et *PmPLT2* (*Plantago* major Polyol Transporter 1 et 2 ; Ramsperger-Gleixner *et al.*, 2004). D'autres transporteurs *MdSOT3*, *MdSOT4* et *MdSOT5* (*Malus domestica* Sorbitol Transporter 3, 4 et 5), ont été isolés par RT-PCR sur ARN totaux de feuilles de pommier, avec des amorces dessinées dans les régions conservées entre *AgMAT1* et son homologue chez la betterave sucrière (Numéro d'accession : U64902 ; Watari *et al.*, 2004). Très récemment, un deuxième transporteur de mannitol du céleri *AgMAT2* a été caractérisé (Juchaux-Cachau *et al.*, 2007).

2.1.1.2. Caractéristiques

Tous les transporteurs de polyols aliphatiques clonés jusqu'à présent partagent des caractéristiques entre eux mais aussi avec les transporteurs de sucres. Tout d'abord, ces ADNc ont des tailles variant de 1 766 à 2 155 pb (*AgMAT1*, Noiraud *et al.*, 2001a ; *MdSOT4*, Watari

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

et al., 2004) pour des séquences en acides aminés déduites de 491 aa à 535 aa. Le poids moléculaire estimé des protéines prédites est compris entre 53 et 58 kDa (*MdSOT4* et *MdSOT5*, Watari *et al.*, 2004) et leurs points isoélectriques entre 6,71 et 9,26 (*MdSOT4*, Watari *et al.*, 2004 ; *PcSOT2*, Gao *et al.*, 2003). Ils appartiennent à la grande famille des Major Facilitator Superfamily (MFS, Marger et Saier, 1993) et présentent les séquences consensus de cette famille : PESPRXL, PETQGRXXXE à la fin des 6ème et 12ème régions transmembranaires, et (R/K)XGR(R/K). Finalement tous les transporteurs de polyols aliphatiques clonés, à l'exception de *MdSOT4* possèdent douze segments transmembranaires, selon le profil d'hydrophobicité de leurs séquences peptidiques. Bien qu'ils soient membres de la sous-famille des transporteurs de sucres, les transporteurs de polyols aliphatiques ne présentent pas d'homologie avec les transporteurs de saccharose, d'hexoses ou de polyols cycliques (Gao *et al.*, 2003).

L'affinité des transporteurs de polyols aliphatiques est variable. En général, elle est très élevée, avec des Km inférieurs à 1 mM. Parmi ces transporteurs à haute affinité, on retrouve AgMAT1 avec un Km = 0,34 mM pour le mannitol (Noiraud *et al.*, 2001a), PcSOT1 et PcSOT2 avec des Km respectifs de 0,6 mM et 0.8mM pour le sorbitol (Gao *et al.*, 2003) ou encore MdSOT3 avec un Km de 0,71 mM pour le sorbitol (Watari *et al.*, 2004). MdSOT5 est considéré comme un transporteur de moyenne affinité avec un Km de 3,2 mM pour le sorbitol (Watari *et al.*, 2004). Enfin certains transporteurs de polyols présentent une très faible affinité pour le sorbitol comme par exemple PmPLT1 (Km = 12 mM) et PmPLT2 dont le Km est trop élevé pour être estimé (Ramsperger-Gleixner *et al.*, 2004).

Il est très important de noter que malgré une affinité relativement élevée pour leur substrat physiologique, chacun de ces transporteurs est capable de transporter le mannitol et le sorbitol avec des taux similaires (Klepek *et al.*, 2005).

2.1.2. Les transporteurs de polyols cycliques

Très peu de données sont disponibles sur les transporteurs de polyols cycliques. Les seuls clonés et caractérisés sont des transporteurs de *myo*inositol.

2.1.2.1. Clonage

Aujourd'hui seuls cinq transporteurs de *myo*inositol ont été clonés chez les végétaux. Premièrement, deux transporteurs *Mitr1* et *Mitr2* (*Mesembryanthenum crystallinum* Inositol Transporter 1 et 2) ont été clonés chez la ficoïde glaciale, *Mesembryanthenum crystallinum*

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

(Chauhan *et al.*, 2000). Un criblage de banque d'ADNc de racine à l'aide d'un ADNc partiel d'ITRs (obtenu par RT-PCR) a permis de cloner l'ADNc *Mitr1* pleine longueur. En parallèle, *Mitr2* (ADNc pleine longueur) a été cloné par RACE-PCR 5' et 3' sur des ARNm de plantules de ficoïde.

Chez *Arabidopsis*, quatre ORFs (Open Reading Frame) ont été identifiés par analyse *in silico* du génome (Schneider *et al.*, 2006), comme transporteurs putatifs homologues aux transporteurs *Mitr1* et *Mitr2* (52 à 73 % en séquences protéiques) et *ScITR1* (*Saccharomyces cerevisiae* Inositol Transporter 1) de levure (Robinson *et al.*, 1996). Les séquences d'ADNc pleine longueur ont ensuite été obtenues par RT-PCR sur ARNm de plante entière (Schneider *et al.*, 2006). Plus précisément, trois ADNc codant des transporteurs de *myo*inositol ont été clonés chez *Arabidopsis thaliana* : *AtINT1*, *AtINT2*, et *AtINT4*. L'ADNc *AtINT3* n'ayant pu être amplifié par RT-PCR (Schneider *et al.*, 2006) et les résultats récents obtenus sur des plants de tabacs et *d'Arabidopsis* surexprimant *AtINT3*, laissent penser que *AtINT3* n'est pas un gène fonctionnel de transporteur de *myo*inositol (Schneider *et al*, 2007).

2.1.2.2. Caractéristiques

2.1.2.2.1. *Mitr1* et *Mitr2*

Mitr1 et *Mitr2* appartiennent à la famille des gènes homologues des ITRs (H^+[or Na^+]/*myo*inositol symporteurs). Les séquences en acides aminés des transporteurs de *myo*inositol de la ficoïde glaciale présentent environ 60% d'identité avec les séquences prédites d'*Arabidopsis*, 28% avec les ITRs de *Saccharomyces cerevisiae* (Drew *et al.*, 1995), et 29% avec le transporteur de *Leishmania donovani* (Chauhan *et al*, 2000).

Ces deux gènes ont des transcrits de 1 800 pb, et des séquences peptidiques déduites de 581 aa (Chauhan *et al*, 2000). Leurs profils d'hydrophobicité prédits *in silico* montrent 12 régions transmembranaires avec les deux extrémités N-terminale et C-terminale dans le cytoplasme de la cellule. De plus ils présentent les deux motifs VGLGVGMASMTXPLYISETSPAKXR (ST2) et SMMFVDRXGRRRLMXIS (ST1), signature des domaines des transporteurs de sucres (Chauhan *et al.*, 2000).

Il est finalement important de remarquer que contrairement à tous les transporteurs étudiés jusqu'à présent, *Mitr1* et *Mitr2* sont des transporteurs de type co-transporteurs Na^+/*myo*inositol.

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

2.1.2.2.2. AtINT4 et AtINT2

AtINT4 et AtINT2 sont des co-transporteurs H+/*myo*inositol. Ils appartiennent à la superfamille des *MST*-like *d'Arabidopsis* (MonoSaccharide Transporter-like), renommée par la suite la famille *AtSTP* (*Arabidopsis thaliana* Sugar Transporter Protein) des transporteurs de monosaccharide localisés au niveau de la membrane plasmique (Büttner et Sauer, 2000 ; Büttner *et al.*, 2007).

Ces deux gènes *AtINT4* et *AtINT2*, codent des protéines respectives de 582 et 580 acides aminés, avec des pI de 8,7 et 8,25 (Schneider *et al.*, 2006 et 2007). Leurs profils d'hydrophobicité indiquent *in silico* la présence de 12 segments transmembranaires. Deux séquences consensus cibles de la N-glycosylation ont été retrouvées chez les deux isoformes. Enfin, ces deux protéines possèdent une boucle « allongée » entre les régions transmembranaires IX et X prédites, comme toutes les protéines putatives de transporteurs de *myo*inositol des clades 2 et 3 de l'arbre phylogénétique de Schneider (Schneider *et al.*, 2007).

Leur affinité a dû être uniquement estimée dans des ovocytes de xénope. En effet, bien que ces deux gènes soient capables de restaurer la capacité de levures mutantes de pousser sur *myo*inositol, leur expression dans ces levures reste faible et les protéines ne semblent pas être adressées à la membrane plasmique. Par conséquent, les valeurs de Km n'ont pas pu être déterminées chez ces levures (Schneider *et al.*, 2006 ; 2007). Les valeurs de Km mesurées dans l'ovocyte de xénope, impliquent que AtINT4 est un transporteur de *myo*inositol à forte affinité (Km = 0,24 mM ; Schneider *et al.*, 2006) alors que AtINT2 est un transporteur de *myo*inositol à moyenne affinité (Km = 0,95 mM ; Schneider *et al.*, 2007). Concernant AtINT2, il a été démontré que son affinité pour le *myo*inositol était voltage-dépendante : plus le potentiel de membrane est élevé, plus son affinité est élevée. De plus, AtINT2 semble être capable de prendre en charge d'autres épimères du *myo*inositol, comme le scylloinositol et le D-chiroinositol, et un dérivé du *myo*inositol, comme le pinitol (Schneider *et al*, 2007).

Enfin, *AtINT1* a également été montré comme étant un co-transporteur H^+/*myo*inositol, mais les auteurs émettent l'hypothèse qu'il pourrait se comporter comme un co-tranporteur Na+/*myo*inositol ou H+/*myo*inositol selon les conditions physiologiques. En effet, à des fortes valeurs de pH (8,5), le transport de *myo*inositol par AtINT1 (et Mitr1) est inhibé mais restauré après ajout de faibles quantités de NaCl (50 mM). Cette hypothèse est même discutée pour l'ensemble des transporteurs de la sous-famille des ITRs (Miyazaki *et al.*, 2003).

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

2.1.3. Les transporteurs type « *AtPLT5* »

Arabidopsis thaliana, membre de la famille des Brassicacées, transporte dans sa sève phloèmienne du saccharose et de faibles quantités de raffinose mais pas de polyols (Haritatos *et al.*, 2000). Néanmoins, cette espèce possède six gènes, identifiés lors de l'annotation systématique du génome, homologues des transporteurs de polyols aliphatiques (Klepek *et al.*, 2005 ; Reinders *et al.*, 2005).

2.1.3.1. Clonage

Les séquences de six gènes putatifs de transporteurs de polyols *d'Arabidopsis* avaient été prédites par analyse *in silico* du génome. Pour confirmer ces prédictions, les ADNc pleine longueur ont été clonés par PCR sur les ARNm de plantes entières, puis entièrement séquencées. A cause de leurs homologies avec les séquences des gènes de transporteurs de polyols de *Plantago major* (*PmPLT1* et *PmPLT2*, Ramsperger-Gleixner *et al.*, 2004), ces ADNc ont été nommés *AtPLTs* pour *Arabidopsis thaliana* Polyol Transporter family (Klepek *et al*., 2005). Cinq des *AtPLTs* ont été isolés et seule l'isoforme *AtPLT5* a fait l'objet d'une étude détaillée.

2.1.3.2. Caractéristiques

AtPLT5 appartient à la superfamille des MST-like et présente 12 segments transmembranaires prédits. La protéine correspondante, constituée de 539 acides aminés, a l'extrémité C-terminale la plus longue des 5 *AtPLTs*. Son pourcentage d'identité avec les transporteurs de polyols d'autres espèces (AgMAT1, PmPLT1, PcSOT1) est de l'ordre de 70% ; ce qui implique un fort degré de conservation de ces protéines entre les espèces (Klepek *et al.*, 2005).

Contrairement aux autres transporteurs de polyols connus, AtPLT5 assure le transport d'une large gamme de sucre, il est ainsi décrit comme « le premier membre d'une nouvelle classe de co-transporeur H^+/sucre » (Klepek *et al.*, 2005). En effet, il a été montré que AtPLT5 était capable d'absorber, avec des taux comparables, des polyols aliphatiques de 3 à 6 carbones (glycérol, erythritol, xylitol, mannitol, sorbitol), des polyols cycliques (inositol, *myo*inositol), des hexoses (glucose, galactose, fucose), des pentoses (xylose, arabinose, ribose), un tetrose (erythrose) et même un acide organique (glucuronate) (Klepek *et al.*, 2005 ; Reinders *et al.*, 2005). Cependant, AtPLT5 n'assure pas le transport des disaccharides comme le saccharose, le cellobiose, le lactose, le maltose et le tréhalose (Reinders *et al.*, 2005). A l'image des autres

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

transporteurs membranaires de sucres, ATPLT5 est un transporteur de type symporteur H^+/substrat, sensible au potentiel membranaire (Klepek *et al.*, 2005).

2.2. Localisation, Expression

Tous les transporteurs de polyols aliphatiques, cycliques et de type *AtPLT5*, étudiés jusqu'à présent, se sont révélés localisés au niveau de la membrane plasmique, sauf *AtINT1*, récemment caractérisé, qui semble être localisé à la membrane tonoplastique (Schneider *et al.*, 2008).

En ce qui concerne leur expression, les transcrits de ces transporteurs ont été trouvés aussi bien dans les organes sources que dans les organes puits. Les transporteurs de polyols aliphatiques sont retrouvés au niveau des feuilles sources (*MdSOT3*, *MdSOT4*, *MdSOT5*, *PmPLT1*, *PmPLT2*), des feuilles jeunes (*MdSOT4*, *MdSOT5*, *PcSOT1*), des fruits en développement (*PcSOT1*, *PcSOT2*) et du phloème du pétiole source de céleri (*AgMAT1*, *AgMAT2*). Les transporteurs de polyols cycliques sont eux aussi retrouvés dans les organes sources : les feuilles (*AtINT2*, *AtINT4*, *Mitr1*) et les organes puits : anthère (*AtINT2*), pollen (*AtINT4*), racines (*Mitr1*). Les transcrits de *AtPLT5* ont été identifiés dans les racines, les tissus vasculaires des feuilles et la fleur (Klepek *et al.*, 2005).

2.3. Rôles

Les transporteurs de polyols aliphatiques sembleraient remplir deux fonctions suivant leur site d'expression. En effet, les *PmPLTs* et les *MdSOTs*, exprimés dans les feuilles, seraient responsables du chargement du phloème en alditols (Watari *et al.*, 2004 ; Ramsperger-Gleixner *et al.*, 2004). Il en est de même pour AgMAT1, préférentiellement exprimé dans les organes puits et le phloème, où il serait impliqué dans le chargement de ces derniers (Noiraud *et al.*, 2001b). *A contrario*, *PcSOT1* et *PcSOT2* pourraient intervenir dans l'accumulation du sorbitol dans les fruits (Gao *et al*, 2003). En ce qui concerne *AgMAT2*, il participerait aux flux complexes de sucres ; par exemple au niveau du pétiole de la feuille, où les sucres sont transportés *via* la sève élaborée vers les organes puits, alors que le pétiole est lui-même un organe puits (Juchaux-Cachaux *et al.*, 2007). De plus, l'expression d'*AgMAT2* chez le tabac s'accompagne d'une diminution de la sensibilité de la plante à un champignon pathogène *Alternaria longipes* (Juchaux-Cachaux *et al.*, 2007). En se basant sur ces résultats, les auteurs ont proposé une nouvelle voie de défense pour résister aux pathogènes sécréteurs

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

de polyols. Cette fonction des transporteurs de polyols pourrait expliquer la présence de ceux-ci (*AtPLTs*) chez les espèces qui ne transportent pas *a priori* les polyols.

La fonction des transporteurs de polyols cycliques n'est pas très bien connue. *AtINT4* pourrait assurer l'approvisionnement des cellules compagnes en *myo*inositol ou la récupération de celui-ci de l'apoplaste (Schneider *et al.*, 2006). *AtINT2* pourrait participer à l'approvisionnement du système vasculaire en inositol (Schneider *et al.*, 2007), et *AtINT1*, seul transporteur de polyols cyclique tonoplastique, serait impliqué dans l'efflux de *myo*inositol depuis la vacuole vers le cytosol (Schneider *et al.*, 2008). *Mitr1* et *Mitr2* semblent être les deux transporteurs pour lesquels la fonction est la mieux connue. Etant donnée la régulation de leur quantité de transcrits par le stress salin, ces transporteurs semblent intervenir dans la résistance à ce type de contrainte (Chauhan *et al* ., 2000).

Enfin, la fonction supposée de *AtPLT5*, serait la récupération de divers composants du métabolisme cellulaire, après leur fuite dans l'apoplaste (Klepek *et al*., 2005).

En conclusion, toutes ces fonctions des transporteurs de polyols restent majoritairement basées sur des observations d'expression et demandent à être confirmées.

2.4. Régulation

Malgré l'importance prouvée des polyols et de leurs transporteurs chez les végétaux (optimisation de l'assimilation de CO_2, résistances au stress osmotique et aux attaques pathogènes), la régulation des transporteurs de polyols reste très peu étudiée. Aucun mécanisme moléculaire n'est précisément décrit, seuls les facteurs pouvant intervenir dans ce processus sont identifiés. On suppose notamment que le stress salin est un facteur qui pourrait intervenir dans la régulation de l'expression des transporteurs de polyols. Dans ce contexte, il a été démontré que ce type de stress induisait la transcription des transporteurs *Mitr1* et *Mitr2* (Chauhan *et al.*, 2000). En effet, en conditions non-stringentes, *Mitr1* est fortement exprimé dans les racines, modérément dans la tige et très peu dans les feuilles, et *Mitr2* est très peu exprimé dans la plante. Lors d'un stress salin (400 mM NaCl), la quantité de transcrits de *Mitr1* augmente dans tous les organes et surtout dans les racines, et celle de *Mitr2* augmente transitoirement dans les feuilles (Chauhan *et al.*, 2000).

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

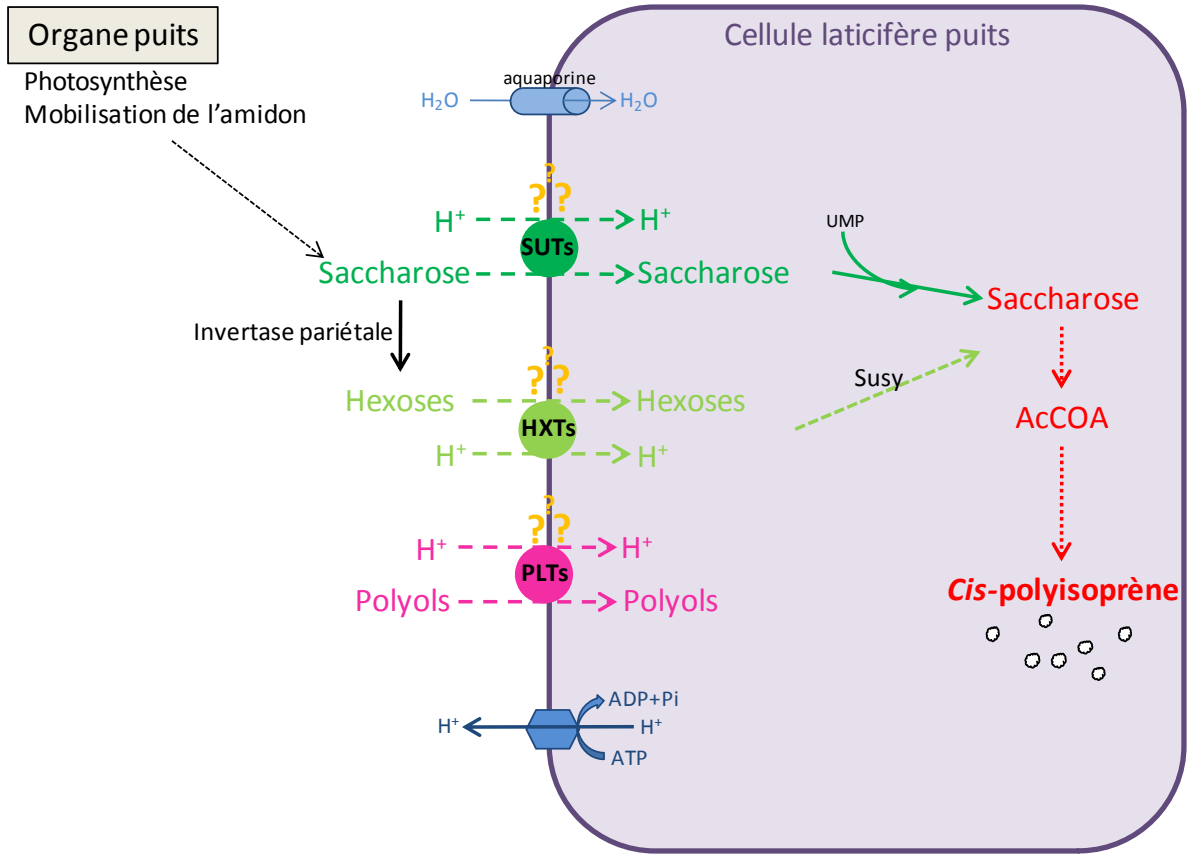


Figure 31 : Schéma hypothétique de l'influx de sucres et de polyols dans les cellules laticifères

Schéma représentant notre hypothèse de départ en s'appuyant sur les données de la littérature.

Ce travail de recherche bibliographique nous a permis de construire un schéma hypothétique de la cellule laticifère, qui nous a servi de point de départ pour notre raisonnement (figure 31). Nous proposons que la cellule laticifère, hautement spécialisée, dont le fonctionnement nécessite un influx de carbone très important, puisse arborer des transporteurs de saccharose et/ou des transporteurs d'hexoses et/ou des transporteurs de polyols. Nos objectifs sont donc d'identifier les transporteurs de sucres et de polyols des cellules laticifères, et de tester leur implication dans la production de latex.

Afin de répondre à ces questions, notre étude a été déclinée en plusieurs étapes. La première consistait en une identification des transporteurs de sucres des cellules laticifères. Des techniques de PCR en présence d'amorces dégénérées et de criblage de banque au moyen de sondes homologues ont donc été développées. Ensuite, nous voulions déterminer des gènes candidats, parmi les transporteurs de sucres clonés, susceptibles d'être impliqués dans la production de latex. Cette étape a été basée sur l'analyse de l'expression des différents transporteurs clonés en conditions de production stimulée à l'éthylène (Ethrel®), chez deux clones au métabolisme contrasté (PB217 et PB260), dans différents tissus (latex et écorce), et sur des arbres dans divers états d'exploitation (arbres vierges, arbres exploités depuis 2 ans). L'objectif était de déterminer un profil d'expression précis de chaque isoforme clonée, dans diverses configurations de production, afin d'estimer son implication potentielle dans ce processus. Les transporteurs les plus pertinents ont fait l'objet d'études plus fines à l'aide de techniques telles que la caractérisation fonctionnelle, l'hybridation *in situ*, le clonage du promoteur et l'immunolocalisation *in situ*.

Toutes les données ainsi obtenues, nous ont permis d'apporter les premiers éléments moléculaires de compréhension de l'influx des sucres et des polyols dans les cellules laticifères ; et aussi de proposer des gènes potentiellement liés à la production de latex. Ces gènes pourraient, après confirmation, servir de marqueur de l'état métabolique ou de production de latex.

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

Résultats

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

Chapitre 1 : Les transporteurs de sucres des cellules laticifères

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

La production de latex est un phénomène propre aux cellules laticifères. Sa régulation est très complexe et dépend principalement de deux facteurs : la régénération entre deux saignées et l'écoulement du latex.

La cause principale de l'arrêt de l'écoulement semble être l'obstruction de l'extrémité sectionnées des laticifères, par les particules de caoutchouc agrégées en microfloculats (Buttery et Boatman, 1966). Cette floculation est induite notamment par la libération du contenu lutoïdique, due probablement à la variation de pression osmotique (Lim *et al.*, 1969), l'effet mécanique de la blessure (Yip et Southorn, 1968) et au caractère déstabilisant du contenu cellulaire des tissus de l'écorce sectionnée (Gomez, 1977).

Quant à la régénération, elle peut également être contrôlée par divers facteurs, parmi lesquels se trouvent notamment le pH cytosolique (Primot, 1977b ; Jacob *et al.*, 1982), les équilibres ioniques (Chrestin *et al.*, 1989) et la disponibilité en ATP et en NADPH (Sipat, 1982 ; Chrestin et Bangratz, 1988).

En amont de toutes ces régulations, l'entrée du saccharose dans les cellules laticifères est considérée depuis très longtemps comme un paramètre clé de la biosynthèse du caoutchouc et donc de la production de latex. En effet, le saccharose est le seul précurseur de la biosynthèse du caoutchouc (Lynen, 1969 ; Tupy et Primot, 1976) et reste la principale forme de glucide du latex (Tupy et Resing, 1969 ; Bealing, 1969). Son rôle dans la productivité a été rapporté par plusieurs auteurs, notamment sur la base des analyses des pratiques d'exploitation (Yeang *et al.*, 1984 ; Tupy, 1984, 1989 ; Eschbach *et al.*, 1986). A titre d'exemple, une variation du mode de saignée conduit à des variations conjointes de la teneur en saccharose du latex et la production de ce dernier, suggérant ainsi un lien significatif entre ces deux traits (Eschbach *et al.*, 1986). D'autres résultats obtenus dans des conditions où le sucre est limitant, ont permis de mettre en évidence des corrélations positives entre les teneurs en sucres et la production (Tupy, 1969b, 1973 c et e ; Eschbach *et al.*, 1986). Enfin, des modèles mathématiques élaborés sur la base des données expérimentales au champ, ont montré que la production maximale de latex est dépendante de la teneur en saccharose (Gohet *et al.*, 2003).

Deux facteurs conditionnent la teneur en saccharose des laticifères : son absorption et son utilisation par le métabolisme laticifère (Tupy, 1973b). La teneur en saccharose intra-laticifère mesurée à un instant donné traduit donc l'équilibre qui s'établit entre son importation et son utilisation par les différentes voies métaboliques de ces cellules (Lacrotte,

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

1991). De ce fait, la capacité des cellules laticifères à absorber le saccharose fourni par les organes sources, apparaît comme un facteur essentiel de la production de latex.

Les cellules laticifères sont dépourvues de plasmodesme (De Faÿ, 1989 ; Pickard, 2008) et l'importation du saccharose se fait uniquement par la voie apoplastique, suggérant l'existence de transporteurs spécifiques au niveau de leur membrane plasmique. La teneur en saccharose de ces cellules pourrait être directement liée à la quantité et à l'activité de ces transporteurs. Les résultats des premières études d'électrophysiologie, ont permis de renforcer l'hypothèse de la présence de co-transporteur H^+/sucres au niveau de la membrane plasmique des cellules laticifères (Lacrotte, 1991 ; Bouteau *et al.* 1992, 1999). Mais aucune étude moléculaire n'a été entreprise jusqu'ici pour valider l'ensemble de ces données physiologiques.

C'est dans ce contexte scientifique que s'inscrit notre hypothèse de travail, selon laquelle les co-transporteurs H^+/saccharose et/ou H^+/hexoses pourraient constituer un facteur limitant pour la production de latex. Notre objectif est double : d'abord identifier les transporteurs de sucres de ces cellules laticifères, puis analyser leur expression en relation avec la production de latex.

Les résultats obtenus dans le cadre de cette partie du travail ont fait l'objet d'une publication acceptée dans *Annals of Botany*. Elle traite du clonage de 7 isoformes de transporteurs de saccharose et d'1 isoforme de transporteur d'hexoses du latex ; ainsi que de l'analyse de leur cinétique d'expression en réponse à l'Ethrel® (un stimulant de la production) chez des arbres vierges du clone PB217. Une corrélation positive entre l'expression de deux isoformes de transporteurs putatifs de saccharose (*HbSUT1A* et *HbSUT2A*) et la production de latex a été mise en évidence. L'expression de ces deux isoformes a fait l'objet d'une caractérisation plus fine, en étudiant leur réponse à d'autres traitements chimiques (hormones) et mécaniques (blessure) et la localisation spatiale de leur transcrits par hybridation *in situ*.

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

Résultats

Annals of Botany **104**: 635–647, 2009
doi:10.1093/aob/mcp150, available online at www.aob.oxfordjournals.org

ANNALS OF BOTANY Founded 1887

Sucrose importation into laticifers of *Hevea brasiliensis*, in relation to ethylene stimulation of latex production

Anaïs Dusotoit-Coucaud[1], Nicole Brunel[1], Panida Kongsawadworakul[2], Unchera Viboonjun[2], André Lacointe[1], Jean-Louis Julien[1], Hervé Chrestin[2,3] and Soulaïman Sakr[1,4,*]

[1]*UMR 547 PIAF, INRA, Université Blaise Pascal, 24 avenue des Landais, 63177 Aubière Cedex, France,* [2]*Department of Plant Science, Faculty of Science, Mahidol University, Rama 6 Road, Bangkok 10400, Thailand,* [3]*Institut de Recherche pour le Developpement (IRD), UR 060 CLIFA/CEFE-CNRS, 1919 route de Mende, F34293, Montpellier Cedex 5, France and* [4]*Agrocampus Ouest, Centre d'Angers, UMR SAGAH, IFR QUASAV 149, 2 rue le Nôtre, 49045 Angers Cedex, France*

Received: 2 February 2009 Returned for revision: 31 March 2009 Accepted: 29 April 2009 Published electronically: 30 June 2009

• *Background and Aims* The major economic product of *Hevea brasiliensis* is a rubber-containing cytoplasm (latex), which flows out of laticifers (latex cells) when the bark is tapped. The latex yield is stimulated by ethylene. Sucrose, the unique precursor of rubber synthesis, must cross the plasma membrane through specific sucrose transporters before being metabolized in the laticifers. The relative importance of sucrose transporters in determining latex yield is unknown. Here, the effects of ethylene (by application of Ethrel®) on sucrose transporter gene expression in the inner bark tissues and latex cells of *H. brasiliensis* are described.
• *Methods* Experiments, including cloning sucrose transporters, real time RT-PCR and *in situ* hybridization, were carried out on virgin (untapped) trees, treated or untreated with the latex yield stimulant Ethrel.
• *Key Results* Seven putative full-length cDNAs of sucrose transporters were cloned from a latex-specific cDNA library. These transporters belong to all SUT (sucrose transporter) groups and differ by their basal gene expression in latex and inner soft bark, with a predominance of *HbSUT1A* and *HbSUT1B*. Of these sucrose transporters, only *HbSUT1A* and *HbSUT2A* were distinctly increased by ethylene. Moreover, this increase was shown to be specific to laticifers and to ethylene application.
• *Conclusion* The data and all previous information on sucrose transport show that *HbSUT1A* and *HbSUT2A* are related to the increase in sucrose import into laticifers, required for the stimulation of latex yield by ethylene in virgin trees.

Key words: *Hevea brasiliensis*, laticifers, latex production, ethylene, sucrose transporters.

INTRODUCTION

Natural rubber (*cis*-polyisoprene) is the main economic product of *Hevea brasiliensis* and is widely used industrially. *cis*-Polyisoprene synthesis takes place in the cytoplasm of highly specialized cells, known as laticifers (latex cells), and is their main metabolic function. Because sucrose is the unique precursor for rubber synthesis, its import into the laticifers may be an important limiting factor in latex production.

Laticifers are periodically differentiated from the cambium and arranged in an isolated network in the inner bark of *H. brasiliensis* (Hébant and de Faÿ, 1980; de Faÿ and Jacob, 1989). The cytoplasm of laticifers, known as latex, is expelled when the bark is wounded or deliberately regularly cut (tapped) to obtain the latex (Gomez, 1976; Gomez and Moir, 1979). Rubber particles represent 30–50 % of the latex in volume and 90 % in dry weight, and therefore laticifers have to regenerate their cytoplasm between two consecutive tappings. Much research has shown that rubber synthesis is brought about through the mevalonate-dependent metabolic pathway (Hepper and Audley, 1969), but more recently, transcriptome studies have suggested that synthesis could also follow a mevalonate-independent pathway (Ko *et al.*, 2003). Both pathways coexist in laticifers and need sucrose as a precursor (d'Auzac, 1964; Chow *et al.*, 2007). In addition, sucrose contributes, together with polyols and potassium, to the generation of the high turgor pressure (0·9–1·5 MPa) in the laticifers and their surrounding cells in the soft bark (liber), which is important for latex flow (Buttery and Boatman, 1966). Moreover, the cytosolic sucrose concentration is used to evaluate metabolic activity of laticifers (Jacob *et al.*, 1988, 1989).

Laticifers are regarded as a strong sink for sucrose and need to be adequately supplied exogenously with sucrose to meet their high carbon and energy demands (Tupy, 1973; Eschbach *et al.*, 1986; Silpi *et al.*, 2007). Based on a few circumstantial observations, active transport across the plasma membrane of laticifers had been hypothesized as the main route of sugar uptake. Ultrastructural studies on mature laticifers showed that they have no plasmodesmata and are therefore apoplastically isolated from adjacent cells (Hébant, 1981; de Fay and Jacob, 1989). Electrophysiological research carried out on isolated laticifers and protoplasts indicates that sucrose is able to depolarize the plasma membrane and this process is sensitive to H^+-ATPase inhibitors (Bouteau *et al.*, 1991, 1992, 1999), suggesting the existence of an energy-dependent, H^+/sucrose symporter in the plasma membrane. However, there are no reports, based on molecular evidence, of the presence of such sucrose transporters in the laticifers.

* For correspondence. E-mail soulaiman.sakr@agrocampus-ouest.fr

© The Author 2009. Published by Oxford University Press on behalf of the Annals of Botany Company. All rights reserved.
For Permissions, please email: journals.permissions@oxfordjournals.org

Thèse Anaïs Dusotoit-Coucaud, 2009

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

Sucrose transporter (SUT) cDNAs have been isolated mainly from herbaceous plants, but also from some woody plants (Lemoine, 2000; Sauer, 2007). Generally, these sucrose transporters belong to the major facilitative superfamily (MFS; Marger and Saier, 1993) and are encoded by a multigenic family. Their activity was reported to be finely controlled (Sakr *et al.*, 1997; Chiou and Bush, 1998; Roblin *et al.*, 1998; Vaughn *et al.*, 2002; Schneidereit *et al.*, 2008) and modulated by exogenous (Juergensen *et al.*, 2003; Meyer *et al.*, 2004; Decourteix *et al.*, 2006) as well as endogenous signals such as sucrose (Chiou and Bush, 1998) and hormones (Chincinska *et al.*, 2008). Phylogenetic analyses have shown that sucrose transporter proteins fall into three independent phylogenetic clades, called SUT1, SUT4 and SUT2 (Barker *et al.*, 2000; Weise *et al.*, 2000; Barth *et al.*, 2003).

Sucrose transporters play a key role in many physiological processes. This is true both for source and for sink organs. For example, *AtSUC5*, specifically expressed in the endosperm, is required for the supply of sucrose to seeds during early stages of development (Baud *et al.*, 2005). Based on comparison of expression patterns of three sucrose transporters of the grape berry (*VvSUC11*, *VvSUC12* and *VvSUC27*), Davies *et al.* (1999) suggested that only two sucrose transporters (*VvSUC11*, *VvSUC12*) might have a significant role in ripening-related sucrose import. Inhibition of *LeSUT2* in tomato by antisense expression resulted in reduction of the number of fruit and the number of seed fertilized per fruit. This phenotype is due to the inability of these organs to download sucrose from phloem, and supports the central role of this sucrose transporter in fruit and seed development (Hackel *et al.*, 2006). *JrSUT1* (from *Juglans regia* sucrose transporter), isolated from xylem parenchyma cells, is involved in sucrose retrieval from the xylem vessel after freezing and thawing (Decourteix *et al.*, 2006) and in providing sucrose to bursting vegetative buds (Decourteix *et al.*, 2008). Although sucrose is the predominant soluble sugar in *H. brasiliensis* latex and is required for rubber synthesis and for latex cell cytoplasm regeneration between tappings, no study has yet focused on the involvement of sucrose transporters in these processes.

As ethylene was shown to be an efficient stimulant of latex yield (Abraham *et al.*, 1968; d'Auzac and Ribaillier 1969), Ethrel® and ethylene gas are commonly used to increase rubber yield in plantations worldwide. This stimulation may occur in several ways: through an increase in sugar metabolism (Tupy, 1973; Tupy and Primot, 1976; Silpi *et al.*, 2006) and the consecutive increase in energy (ATP) availability (Amalou *et al.*, 1992), by increased sugar import (Lacrotte *et al.*, 1985) and by a hyperpolarization of the laticifer's plasma membrane (Bouteau *et al.*, 1992), suggesting a possible stimulation of H^+-ATPase plasma membrane by ethylene application, activity of which is required for a plasma membrane H^+-symporting sucrose transporter.

Rubber biosynthesis is the major metabolic feature of laticifers, and requires exclusively sucrose as precursor. These cells are a metabolically active sink but are apoplastically isolated from neighbouring cells. Therefore, to meet adequately their substantial carbon and energy needs, they have to import sucrose through hypothetical plasma membrane sucrose/H^+ symporters. Our hypothesis is that these kinds of transporters (sucrose/H^+ symporters) may be localized on the plasma membrane of laticifers and are positively regulated by ethylene application to increase sucrose import, required for the stimulation of latex production by ethylene. The present study was carried out on unexploited (virgin) trees treated or untreated with the latex yield stimulant Ethrel. Mature virgin trees were used to analyse independently the direct effects of ethylene *per se* upon a first tapping, and then upon a second tapping to study the combined effects of ethylene and of the metabolic changes due to the previous tapping (latex regeneration demand) on sucrose transporter gene expression. In addition, study was made of the clone PB217, which is characterized by medium rubber production and metabolic activity without ethylene stimulation, but with high latex yield when treated with ethylene (Gohet, 1996; Gohet *et al.*, 1997, 2003).

Among seven sucrose transporter cDNAs identified, the relative transcript level of two isoforms (*HbSUT1A* and *HbSUT2A*) is found to be increased by ethylene application. Further characterization showed that they were induced specifically by ethylene. In addition, their localization in the inner bark tissues and especially in the latex cells was confirmed by *in situ* hybridization. The data show that these two isoforms could play an essential role in sucrose import into laticifers of virgin trees, necessary for ethylene-stimulated latex production.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

Latex and bark samples were collected from the trunk of mature virgin rubber trees (about 8 years old) of the PB217 clone in the Bongo/SAPH plantation (Côte d'Ivoire). Latex samples were collected as described by Pujade-Renaud *et al.* (1994). Briefly, after discarding the first 20 drops, the latex samples were collected as a mixture of 2 mL from three trees per treatment in an equal volume of 2× fixation buffer. The samples were immediately deep-frozen in liquid nitrogen and stored at $-80\,^{\circ}C$.

Back-cutted trees (cut 6 months earlier) grown in a controlled environment chamber at CPN (Composants Naturels, Michelin Group, Clermont-Ferrand, France) were used to analyse the gene expression patterns of the sucrose transporter in different organs (mature leaves, bark and xylem) and for *in situ* hybridization (stems). These young trees were grown with 12 h daylight of 40 $\mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$ photosynthetically active radiation, at 27–30 °C, with 70 ± 10 % relative humidity, and at 25 °C, with 90 % relative humidity (night). Each pot of 160 L, filled with potting mix, was connected to a watering system and sprayed to maintain high atmosphere and soil moisture.

Field experiments of ethylene treatments

Seven batches of three homogeneous (in growth) mature virgin trees were selected as described by Pujade-Renaud *et al.* (1994) and Sookmark *et al.* (2002): two as a control (treated with palm oil only) and five treated with 1 mL of 2·5 % Ethrel® emulsion (approx. 70 mM ethephon) in crude palm oil on a 1-cm-wide, slightly scraped bark band and just beneath the next tapping cut, for 4, 8, 16, 24 and 40 h,

respectively, before the first sampling. To avoid the influence of possible weather variations, in all experiments the trees were opened (tapped for the first time) on a half spiral with a tapping knife, and the latex and the bark samples were collected for analysis on the same day and at the same time. The homogenous depth (approx 1 mm from the cambium) of tapping was tested with a sharp calibrated punch.

After a 3-d rest (without further stimulation), latex and bark samples from the same trees were collected again and analysed as the second tapping (Tap2).

Hormones and other bark treatments

As the relative transcript level of sucrose transporters was reported to be regulated by hormonal treatments such as gibberellins (Chincinska *et al.*, 2008), ethylene (Chincinska *et al.*, 2008), auxin (Harms *et al.*, 1994) and cytokinin (Harms *et al.*, 1994; Ehness and Roitsch, 1997), we wanted to check whether various hormone or wounding treatments could induce any effect on laticifer SUT expression. To do this, a protocol similar to that for ethylene application was used. Briefly, two batches were used as controls (treated with 1 g palm oil containing 0·05 % Tween 20), and four others were treated with 1 g of 2 % jasmonic acid (JA), 1 % salicylic acid (SA), 1·5 % 4-chlorophenoxyacetic acid (CPA, auxin analog) and 2 % abscissic acid (ABA) palm oil emulsion with 0·05 % Tween 20, and a last batch was mechanically wounded by sealing 15 nails up to the cambium (Nails), on an approx. 1-cm-wide, slightly scraped bark band, just beneath the next tapping cut, for 4, 8 and 16 h, respectively, before the first tapping. The latex and bark samples were collected on the same day and analysed as the first tapping (Tap1) in the same way as for the Ethrel experiment. After a 3-d rest, samples from the batches of the 4-h-treated trees were collected again and analysed as the second tapping (Tap2).

*Molecular cloning of sucrose transporter (*HbSUTs*) full-length cDNA*

Four latex and bark sucrose transporter probes were obtained by polymerase chain reaction (PCR) directly on latex or bark cDNA libraries, kindly provided by the team of Dr P. Kongsawadworakful, Unchera Viboonjun and H. Chrestin (Mahidol University, Bangkok, Thailand). For this purpose, degenerate primers were designed from conserved regions of published plant sucrose transporter cDNAs (EMBL data library). One primer couple was used for each SUT group: SUT1 group [primer SUT1F (5′-TA/TC/TA/GA/GC/TACA/C/TGAC/TTGGA/TTG/TGG-3′) and primer SUT1R (5′-TA/TC/TYACA/C/TGAYTGGA/TTKGG-3′)], SUT2 group [primer SUT2F (5′-CATTTA/GCCA/C/TCCC/G/TGCA/TATGCA-3′) and primer SUT2R (5′-ACTCCG/TATA/C/TGCCAAA/G/TCCTTGC/TCC-3′)] and SUT4 group [primer SUT4F (5′-AA/GATC/TTATGGCGGTGAACC-3′) and primer SUT4R (ACA/GCCCAA/TA/TGAC/TAAGCCTTGA/TCC)]. Amplifications were carried out in a thermal cycler (PTC-200; MJ Research, Watertown, MA, USA) using standard protocols (Decourteix *et al.*, 2006). The different amplified fragments were cloned and sequenced, and then used as SUT homologous probes to screen the latex cDNA libraries under low-stringency conditions. Seventeen clones were obtained and fully sequenced. Their nucleotide sequence alignment showed that they corresponded to seven different isoforms, referred to as *HbSUT1A*, *HbSUT1B*, *HbSUT2A*, *HbSUT2B*, *HbSUT2C*, *HbSUT4* and *HbSUT5* (*H. brasiliensis* sucrose transporters). In addition, the sequences of five of them (*HbSUT1A*, *HbSUT2A*, *HbSUT2B*, *HbSUT4* and *HbSUT5*) were identical to *H. brasiliensis* SUT sequences, concomitantly registered in the EMBL/GenBank/DDBJ under accession numbers DQ985466, DQ985467, DQ985465, EF067335 and EF067333, respectively (Yang *et al.*, 2006, direct submission). The *HbSUT1B* and *HbSUT2C* sequences were registered in the EMBL/GenBank/DDBJ under accession numbers AM492537 and AM491808, respectively.

RNA extraction

Total RNAs were extracted from latex as described by Pujade-Renaud *et al.* (1994, 1997) and developed by Sookmark *et al.* (2002). Total inner bark RNA extraction from mature trees used the caesium chloride cushion method, adapted from Sambrook *et al.* (1989), using approx. 2 g of inner bark ground under liquid nitrogen.

Deep-frozen leaves, bark and xylem samples collected from back-cutted trees were ground in liquid nitrogen and total RNAs were extracted using CTAB extraction buffer (Chang *et al.*, 1993) and then treated with RNase-free RQ1 DNase (Promega, Madison, WI, USA). mRNAs were spectrophotometrically quantified and checked by agarose gel electrophoresis.

Specific primer for real-time RT-PCR

Primer couples specific to each isoform were designed for real-time RT-PCR: *HbSUT1A* [primer SUT1AF (5′-CAG CTTTTGTGGTGGGGGCGA-3′) and primer SUT1AR (5′-T GCACATCTATATGATCACATCCA-3′)], *HbSUT1B* [primer SUT1BF (5′-CAGCTTTTGTGGTGGGAGGGG-3′) and primer SUT1BR (5′-CCAATTTTTGGCCATTGATGCCC-3′)], *HbSUT2A* [primer SUT2AF (5′-GGTTTTCATTTTGGCTAACGA CTG-3′) and primer SUT2AR (5′-TGATAAAGCACTCATCT TTTTACA-3′)], *HbSUT2B* [primer SUT2BF (5′-GGCTTTCC TCTTGCTATTACG-3′) and primer SUT2BR (5′-GTAAACTC AATTGAAGTGTTTCAGTC-3′)], *HbSUT2C* [primer SUT2CF (5′-TCCTTTGAAAGCATGCGCTAAT-3′) and primer SUT 2CR (5′-GTAAACTCAATTGAAGTGTTTCAGTC-3′)], *HbSUT4* [primer SUT4F (5′-GCAGTTCTTGGTGTTCCGT-3′) and primer SUT4R (5′-TCAATGGACTGTTATCTGCAAA-3′)], *HbSUT5* [primer SUT5F (5′-GCAGTTCTTGGTGTTCCAC-3′) and primer SUT5R (5′-ATGCTGGCATCCAATCGGATG-3′)]. The specificity of each primer pair was tested by semi-quantitative and real-time RT-PCR on each full-length cDNA cloned in pGEM-T easy vector (Promega). PCR reactions were performed as described below for real-time RT-PCR.

Besides sucrose transporters, the expression pattern of the glutamine synthetase gene (*HbGS*) was monitored by using the specific primer pair HbGS_F (5′-GCTGGCATCAACATT AGTGG-3′) and HbGS_R (5′-CAACGCCCCATAAGAAAG TG-3′)]. *HbGS* has been reported to be a good marker of the ethylene effect on gene expression in latex (Pujade-Renaud *et al.*, 1994, 1997). For bark tissue, the expression pattern of the ethylene-induced gene ACC oxidase (1-aminocyclopropane-

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

1-carboxylate oxidase) was determined as a positive control of the response to ethylene (Kongsawadworakul *et al.*, 2004). The specific primer pair used was: HbAccOx_F (5′-ATGGACACA GTTGAGAGGATGAC-3′) and HbAccOx_R (5′-AGGTGG CGGAGGAAGAAGG-3′)].

Quantification of sucrose transporter transcripts by real-time RT-PCR

After treatment with DNase I, 2 μg of total RNA was used as the template in the first-strand cDNA synthesis reaction, according to the manufacturer's instructions (SuperScript-III, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Real-time PCR was performed using the generated cDNA as target template, a fluorescent dye SYBR-Green and an iCycler system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). cDNA encoding actin was used as the internal control gene. PCR reactions were performed as follows: 5 min at 95 °C for denaturation, 20 s at 95 °C, 20 s at 58 °C and 20 s at 72 °C for amplification, and 10 min at 72 °C for final extension. ΔCt was calculated from the formula $\Delta Ct = Ct_{(\text{treated sample})} - Ct_{(\text{control sample})}$. The normalized expression ratio (Q_r) was calculated using the comparative Ct method, with the formula: $Q_r = E^{-\Delta\Delta Ct}$ (E = efficiency of the primer couple, $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{sucrose transporter}} - \Delta Ct_{\text{actin}}$). This method makes it possible to visualize the increase ($Q_r > 1$) and decrease ($Q_r < 1$) of genes (up- and downregulation, respectively). The efficiency of each primer pair was previously evaluated and found to be between 1·75 and 1·85. To compare the relative abundance of transcripts in different organs, expression was calculated from: $\text{Expression} = E^{\text{Ct(actin)}-\text{Ct(sugar transporter)}}$ as given in the Bio-Rad real-time PCR Application Guide.

Statistical analysis

As empirical errors in Q_r increased with Q_r values, consistent with the above exponential formulation, statistical procedures were performed on log-transformed data. Two samplings, each consisting of two independent plants, were used to estimate an unbiased biological error (with two degrees of freedom) for comparison of means using Student's *t*-test. Results were considered to be statistically different at $P < 0{\cdot}01$.

In situ *hybridization*

Tissue preparation was done according to Brunel *et al.* (2002). Transverse sections, 12 μm thick, were cut with a rotary microtome, mounted on SuperFrost Plus slides (Fisher Scientific, Elancourt, France) and dried at 42 °C for 2 d. Paraffin was removed via two baths (10 min each) in Histoclear II. Slides were progressively rehydrated in an ethanol series and then washed for 5 min in DEPC water and twice in 1× phosphate-buffered saline (PBS). Slides were treated with proteinase K at 10 μg ml^{-1} in 1× PBS at 37 °C for 15 min and then incubated in glycine at 0·2 % in 1× PBS at room temperature for 2 min. After two washes in 1× PBS, slides were fixed in 4 % paraformaldehyde (in 1× PBS) for 10 min, rinsed in 1× PBS and then acetylated using 0·5 % acetic anhydride in 0·1 M triethanolamine for 10 min and rinsed in 1× PBS. Before hybridization, sections were dehydrated in an ethanol series. Sections were hybridized with equal concentrations (1·5 ng μL^{-1}) of either sense or antisense probes in 1× Denhart's, 10 % dextran sulfate, 1 mg ml^{-1} tRNA, 50 % formamide, 1× salts (300 mM NaCl, 10 mM Tris–HCl, pH 6·8, 10 mM NaH_2PO_4, 10 mM Na_2HPO_4 and 5 mM EDTA), and incubated at 50 °C overnight in a humid chamber. Sections were washed twice in 2× saline sodium citrate (SSC), six times in 0·1× SSC for 15 min at 42 °C each and twice in 1× PBS for 10 min at room temperature. Detection of digoxigenin (DIG)-labelled probes used an anti-digoxigenin alkaline phosphatase conjugate (Poupard *et al.*, 2001). After suitable colour development, the reaction was stopped by rinsing in water and the sections were dried and mounted in Eukitt. Sections were observed under a Zeiss Axioplan 2 microscope and with an AxioCam HR camera (Zeiss) with AxioVision digital imaging software.

RESULTS

Latex production

Application of Ethrel® under the tapping-cut significantly stimulated latex yield (Fig. 1), especially for the first tapping (Tap1). In comparison with the control of Tap1, latex production increased strongly by 16 h and reached its maximum value 40 h after treatment (27-fold more than in the control). The standard deviation for the marked increase in yield was very large, suggesting substantial heterogeneity in the response between trees. Nevertheless, the treatment differed significantly from the control. For the second tapping (Tap2), latex production increased only weakly at 4 h (three-fold) and remained constant until 40 h after treatment.

Cloning cDNA of putative sucrose transporters from latex

Degenerated oligonucleotide primers from conserved regions of each group of sucrose transporters (SUT1, SUT2 and SUT4) were used and allowed cloning of four different amplification products from latex and bark libraries. These four probes were used for screening a latex cDNA library, which led to the identification of seven full-length cDNA-encoding putative sucrose transporters. Based on their sequence homologies, two isoforms (*HbSUT1A* and

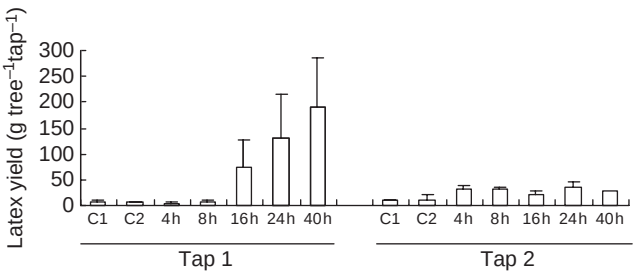


FIG. 1. Latex yield of virgin PB217 trees after ethylene stimulation. Batches of three homogenous mature virgin trees were treated with 5 % Ethrel® (ethylene) 4, 8, 16, 24 or 40 h before the first simultaneous tapping (Tap1). After 3 d without any further treatment, the same trees were tapped again (Tap2). C1 and C2 represent two batches of three trees, which were un-stimulated as controls. Latex yield is expressed in grams of fresh latex per tree per tapping. Bars represent the biological standard deviation.

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

HbSUT1B) were found to belong to the SUT1 group, three (*HbSUT2A*, *HbSUT2B* and *HbSUT2C*) to the SUT2 group and two others (*HbSUT4* and *HBSUT5*) to the SUT4 group.

Further investigations showed that *HbSUT1A*, *HbSUT2A*, *HbSUT2B*, *HbSUT4* and *HBSUT5* were identical to those concomitantly registered by Yang *et al.* (direct submission, 2006) in the EMBL/GenBAnk/DDBJ under accession numbers DQ985466, DQ985467, DQ985465, EF067335 and EF067333, respectively. The new *HbSUT1B* and *HbSUT2C* full-length nucleotide sequences were registered in the EMBL/GenBank/DDBJ under accession numbers AM492537 and AM491808, respectively.

All these putative transporters belonged to the MFS and shared main characteristics with the previously cloned sucrose transporters. Their nucleotide sequence contained an open reading frame ranging from 1·5 to 1·9 kb that encoded 500 to 633 amino-acid polypeptides. In addition, their predicted amino-acid sequences exhibited highest identity to those of *Ricinus communis* (about 83 %) and *Manihot esculenta* (about 90 %), both of which belong, like *H. brasiliensis*, to the Euphorbiaceae family. According to the proposed classification of sucrose transporters (Sauer, 2007), these were divided into three groups (Fig. 2; accession numbers of the sequences presented are given in the Appendix). *HbSUT1A* and *HbSUT1B* belong to Group II, which contains sucrose transporters involved in phloem loading and sucrose import into different sink organs. *HbSUT2A*, *HbSUT2B* and *HbSUT2C* fall into Group III, which contains more amino acids than all the other sucrose transporters, due to the presence of an extended N-terminal domain and a central cytoplasmic loop. *HbSUT4* and *HbSUT5* belong to Group IV, with sucrose transporters characterized by low affinity/high capacity and specific localization in either the plasma membrane (Weise *et al.*, 2000) or the tonoplast (Endler *et al.*, 2006). For the following, we refer to the classification comprising the SUT1, SUT2 and SUT4 groups.

Basal expression of putative sucrose transporters in latex and bark of untreated virgin trees

Because 3′ untranslated region (UTR) sequences are the most divergent regions within isoforms (Lerchl *et al.*, 1995; Duval

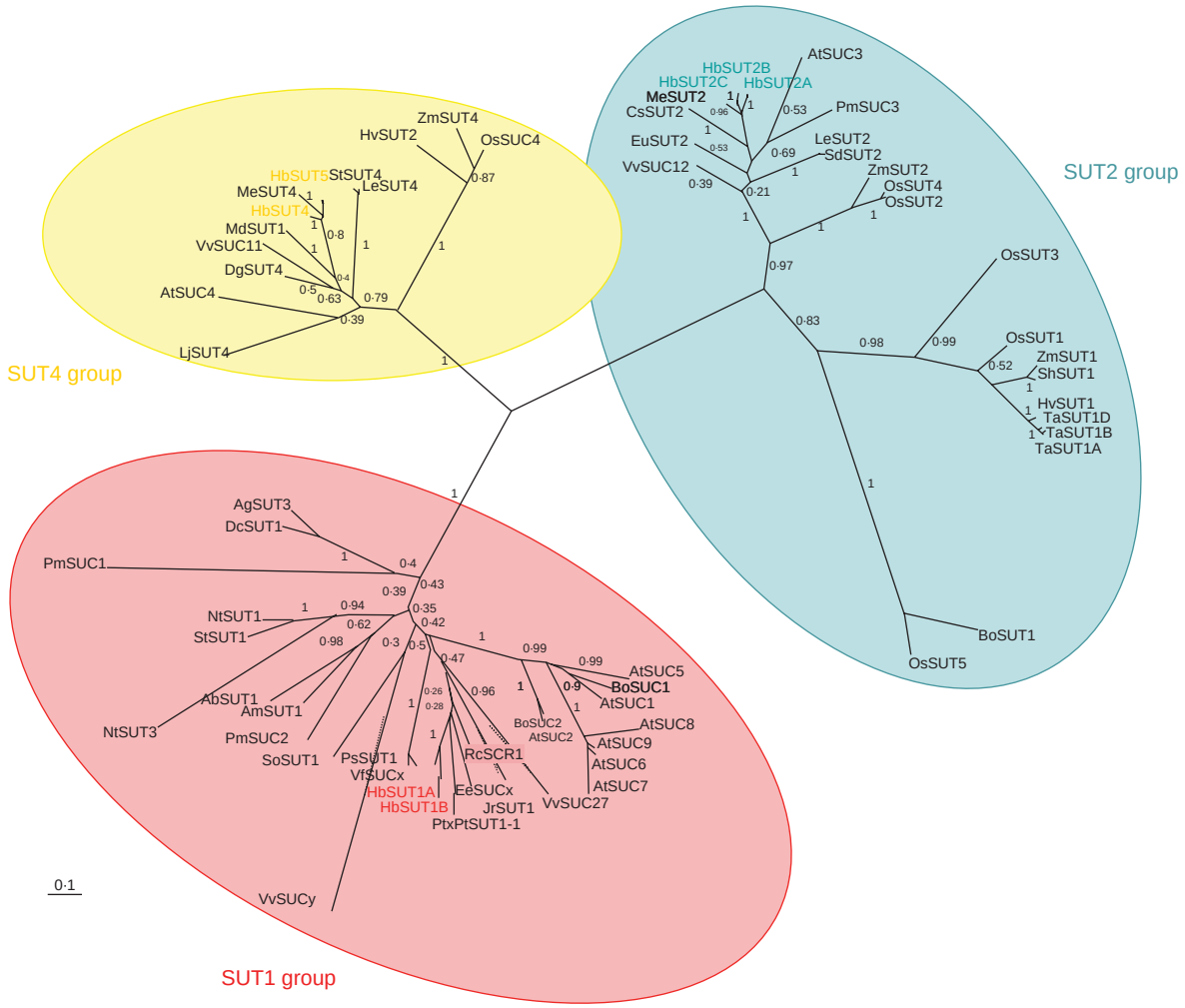


FIG. 2. Phylogenetic tree of plant sucrose transporters. Confirmed or predicted plant sucrose transporter sequences from public databases (EMBL/GenBank/DDBJ) were used to construct a phylogenetic tree. Deduced protein sequences were aligned using *MU*ltiple *S*equence *C*omparison by *L*og-*E*xpectation (http://www.ebi.ac.uk/Tools/muscle/). The tree was constructed using the program PhyML (http://www.phylogeny.fr/version2_cgi/one_task.cgi?task_type=phyml) and Treeview. Internal labels indicate bootstrap values (100 bootstraps).

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

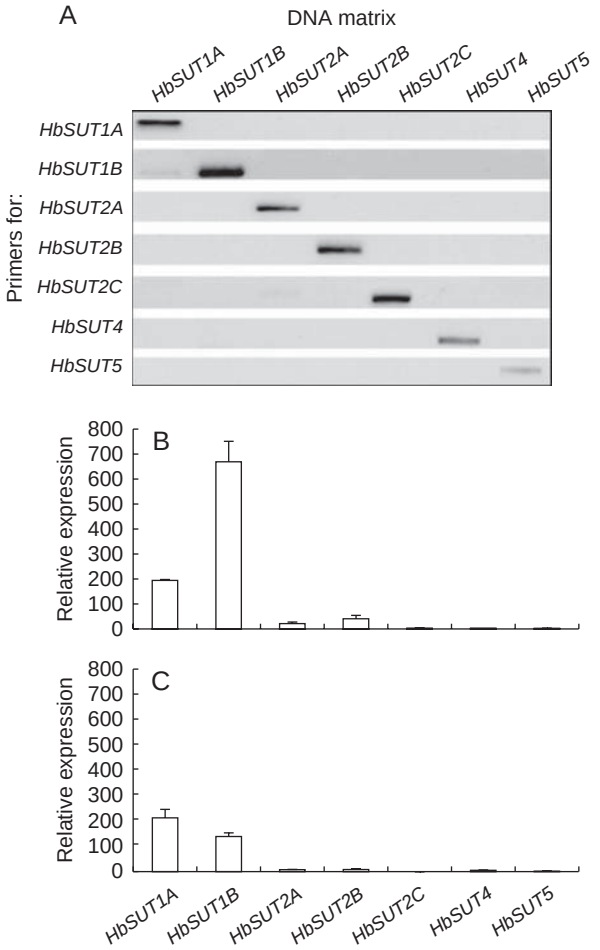


FIG. 3. Specificity of the different primers and basal expression of different sucrose transporters in latex and bark of virgin trees. (A) Specificity, and (B) basal expression of different *HbSUT* isoforms in latex and (C) in bark. The relative expression of *HbSUT*s was determined by real-time RT-PCR in bark and latex, using actin expression as control.

et al., 2002; Morey *et al.*, 2002; Sakr *et al.*, 2003; Decourteix *et al.*, 2006, 2008) most of the eight primer pairs were designed in this region to specifically amplify each of the eight isoforms. The specificity of each primer pair was verified by PCR amplification using the purified cDNA clone of each different isolated sucrose transporter from latex, such as templates. Figure 3A shows that each primer pair only recognized and amplified the cDNA of the sucrose transporter isoform that they were designed from. Such specificity allowed us to investigate the expression of each sucrose transporter in the latex and bark, in response to tapping and ethylene treatment.

First, the basal expression of different sucrose transporters from untreated virgin trees was investigated in latex. The sucrose transporter isoforms of the SUT1 group (*HbSUT1A* and *HbSUT1B*) were predominantly expressed in the resting latex cells (untapped, unstimulated), with *HbSUT1B* as the most abundant sucrose transporter isoform in latex (Fig. 3B). Compared with the SUT1 group, members of the SUT2 group, mainly *HbSUT2A* and *HbSUT2B*, showed very low basal expression. However, lowest expression was for the two isoforms (*HbSUT4* and *HbSUT5*) of the SUT4 group and one isoform (*HbSUT2C*) of the SUT2 group.

As latex comes from the laticifers that are embedded in the inner soft bark tissues, basal expression of these transporters in bark was also investigated (Fig. 3C). All the transporters were detected, to varying degrees, in the inner bark. Again, *HbSUT1A* and *HbSUT1B* were the most highly expressed isoforms. *HbSUT1B* was weakly expressed in the inner bark compared with latex, suggesting a preferential expression of these two transporters in the laticifers.

Ethylene effect on sucrose transporter expression profiles in latex

To confirm that ethylene treatment of bark stimulated gene expression in the laticifers, the relative transcript level of *HbGS* was investigated as a positive ethylene-responsive gene in these cells (Pujade-Renaud *et al.*, 1994, 1997). *HbGS* increased in the latex cells, starting within 16 h of ethylene treatment, with a maximum (18-fold) after 24 h (Tap1, Fig. 4A). This response was prolonged for the second tapping, regardless of when the ethylene treatment was applied, with a maximum (ten-fold expression compared with the control) at 8 and 16 h (Tap2, Fig. 4A). As shown in Fig. 4, the effect of ethylene treatment not only differed between the sucrose transporter isoforms, but also between the first (Tap1) and the second (Tap2) tapping. The transcripts of *HbSUT1A* (Fig. 4B) and, to a lesser extent, of *HbSUT2A* (Fig. 4C) were found to be the most responsive to ethylene treatment.

No significant effect was observed at the Tap1 within the first 8 h following ethylene treatment. At 16 h, the transcripts of *HbSUT1A* and *HbSUT2A* increased 16- and six-fold, respectively (Fig. 4B, C). This accumulation was abrupt and transient for *HbSUT1A*, whereas it was progressive and maximum after 40 h for *HbSUT2A*. Transcripts of *HbSUT2B* and *HbSUT2C* were very slightly and transiently increased by ethylene. No significant ethylene effect was detected for *HbSUT4* and *HbSUT5* (Fig. 4D). Of all these sucrose transporters, *HbSUT1B* was the only isoform for which expression was decreased by ethylene stimulation after 24 h treatment (Fig. 4B).

In contrast to Tap1, there was hardly any regulation of the sucrose transporter transcripts during Tap2. However, a slight and transient induction was observed for *HbSUT1A* between 8 and 16 h after ethylene treatment (Fig. 4B–D).

Ethylene effect on the expression profiles of the putative sucrose transporters in the inner bark

First, ethylene treatment was confirmed to induce an early (4 h) and strong (up to 200-fold) accumulation of ACC oxidase transcripts (Kongsawadworakul *et al.*, 2004) during the first and second tappings (Fig. 5), which validated the ability of the ethylene bark treatment to regulate gene expression in the soft inner bark.

At Tap1, most of the sucrose transporter transcripts either remained constant or decreased (Fig. 5B–D). Only the *HbSUT2B* isoform was weakly and transiently increased at 40 h (Fig. 5C). During Tap2, *HbSUT1A*, *HbSUT2B* and *HbSUT4* were transiently increased with a maximum around 16 h (Fig. 5C, D). The increase in transcripts was strongest

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

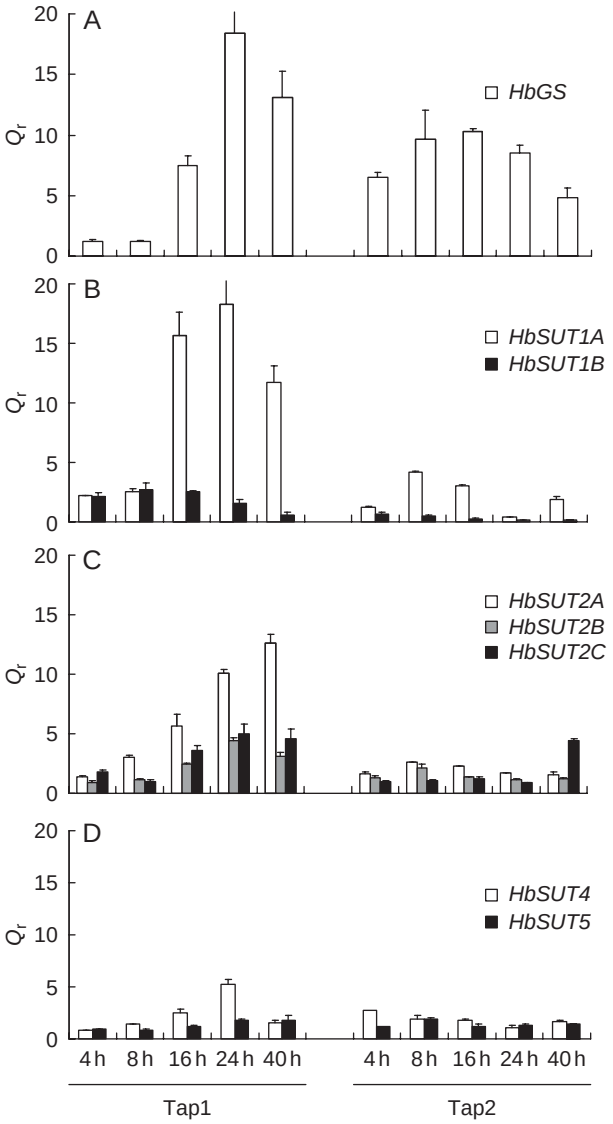


FIG. 4. Transcript accumulation of glutamine synthetase and different sucrose transporters after ethylene stimulation in virgin tree latex. Relative transcript levels of glutamine synthetase (A), and sucrose transporters of SUT1 group (B), SUT2 group (C) and SUT4 group (D) were monitored in latex of ethylene-treated virgin trees. Latex mRNA from mature virgin trees (PB217) was used for real-time RT-PCR. Q_r was obtained by the $E^{-\Delta\Delta Ct}$ methods. Bars represent the technical standard deviation.

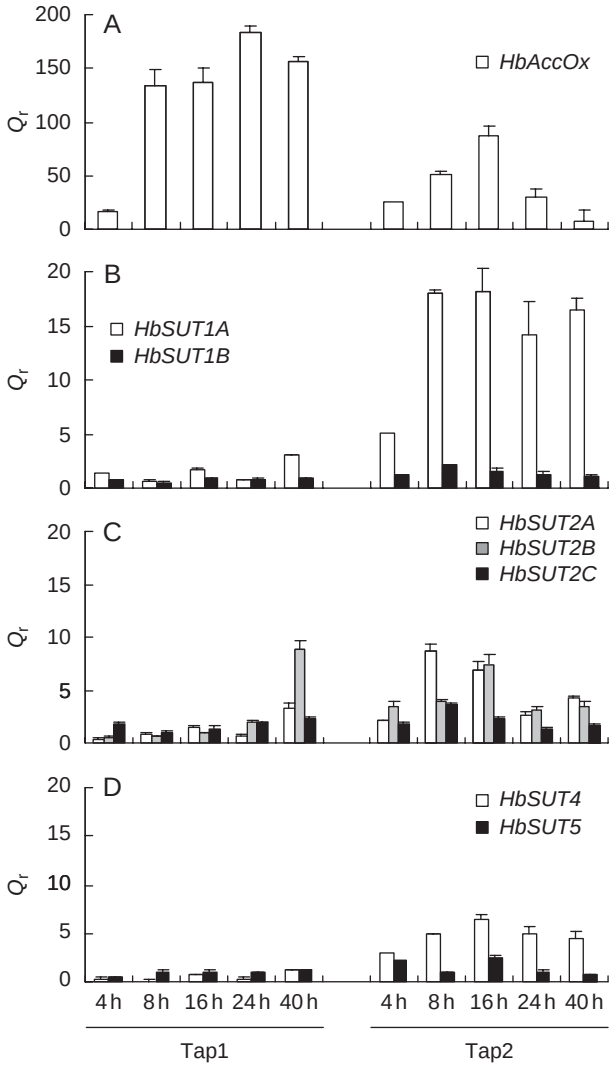


FIG. 5. Transcript accumulation of ACC oxidase and different sucrose transporters after ethylene stimulation in bark of mature virgin trees. Relative transcript levels of ACC oxidase (A) and sucrose transporters of SUT1 group (B), SUT2 group (C) and SUT4 group (D) were monitored in bark of ethylene-treated virgin trees. Bark mRNA samples from virgin mature trees (PB217) were used for real-time RT-PCR. Q_r was obtained by the $E^{-\Delta\Delta Ct}$ method. Bars represent the technical standard deviation.

for the *HbSUT1A* isoform, which was markedly increased at 4 h, and reached a plateau between 8 and 40 h (Fig. 5B).

Effect of hormones and wounding on expression of HbSUT1A, HbSUT2A *and* HbSUT2B *in the latex*

As *HbSUT1A*, *HbSUT1B* and *HBSUT2A* were found to be significantly regulated by ethylene, the effects of various hormonal and wounding treatments applied to bark on their respective expression in latex were also investigated. For *HbSUT2A*, no significant increase was observed, regardless of the treatment, whereas *HbSUT1A* exhibited an early, transient and low stimulation in the presence of SA and CPA (Fig. 6A, C). CPA and, to a lesser extent, the other treatments (especially JA) were found to induce a significant accumulation of *HbSUT1B* at Tap1 (from 8 h after treatment) and Tap2 (Fig. 6B).

HbSUT1A, HbSUT1B *and* HbSUT2A *expression in different organs*

HbSUT1A, *HbSUT1B* and *HbSUT2A* gene expression analysis was carried out by real-time PCR, using RNAs from leaves, bark and xylem of young back-cutted trees. These three transporters were detectable to varying degrees in the source and sink organs (Fig. 7). *HbSUT1A* was more highly expressed in sink organs (xylem and bark) than in leaves. *HbSUT1B* was predominantly expressed in leaves and bark, but relatively weakly in xylem. A similar pattern but of a reduced magnitude was found for *HbSUT2A*.

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

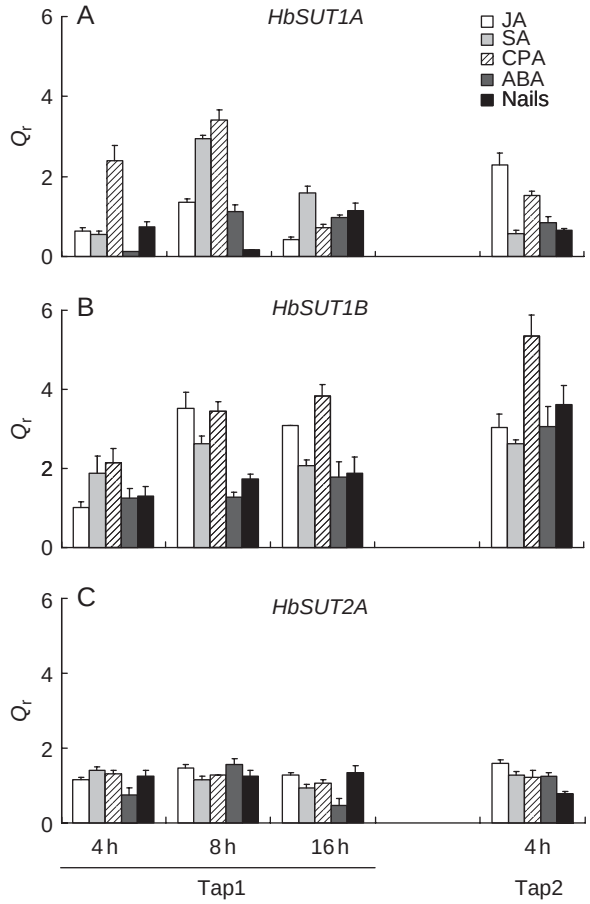


FIG. 6. Transcript accumulation of ethylene-modulated *HbSUT1A*, *HbSUT1B* and *HbSUT2A* after hormonal treatment or wounding in latex of mature virgin trees. Relative transcript levels of *HbSUT1A* (A), *HbSUT1B* (B) and *HbSUT2A* (C) were monitored in latex of virgin trees treated with jasmonic acid (JA), salicylic acid (SA), 4-chlorophenoxyacetic acid (CPA, an auxin analogue), abscissic acid (ABA) or nails planting. Latex mRNA samples from these trees were used for real-time RT-PCR analysis of *HbSUT1A*, *HbSUT1B* and *HbSUT2A* transcripts. Q_r was obtained by the $E^{-\Delta\Delta Ct}$ method. Bars represent the technical standard deviation.

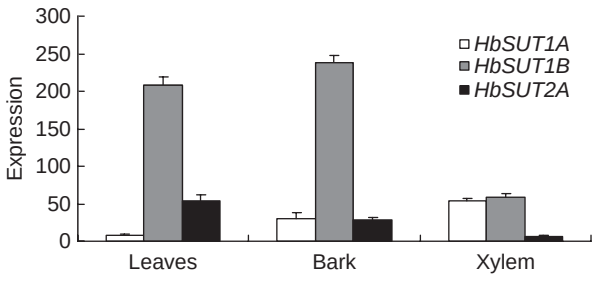


FIG. 7. Transcript accumulation of *HbSUT1A*, *HbSUT1B* and *HbSUT2A* in different organs of young virgin trees. cDNA from leaves, bark and xylem of young back-cutted trees (cut-back 6 months earlier) were used as matrix for real-time RT-PCR analysis of *HbSUT1A*, *HbSUT1B* and *HbSUT2A* transcripts. Expression = $E^{Ct(\text{actin})-Ct(\text{sugar transporter})}$. Bars represent the technical standard deviation.

In situ *hybridization*

Experiments were carried out with two types of probes: the first was specific to *HbSUT1A* and *HbSUT1B* (SUT1 group), which exhibit strong sequence identity, and the second was quite *HbSUT2A*-specific. As shown in Fig. 8A and B, young stems of *H. brasiliensis* contain some isolated laticifers exclusively localized in the phloem region, near cambial cells.

A typical colouration (violet staining) was only detected with the antisense probe (Fig. 8E, F, I, J), whereas no signal was observed with the sense probe (Fig. 8C, D, G, H), suggesting that the colouration indicates the presence of transcripts of *HbSUT1s* or *HbSUT2A*.

With regard to *HbSUT1* mRNAs, colouration was found in inner bark tissue, more precisely in young phloem, laticifers and the cambial zone. No colouration was found in xylem tissue, implying limited or no expression of these transporters. Similar data were found for *HbSUT2A*, for which a positive hybridization signal was also mainly confined to the cambial zone and the phloem tissue. However, a weaker colouration than for the *HbSUT1* probe was observed in the fusing young latex cells.

DISCUSSION

Due to their active metabolism in the synthesis of rubber, laticifers are a strong sink and require substantial and rapid sucrose import to meet their carbon and energy demands. Ethrel® is often used as latex yield stimulant (Tupy, 1973). A series of field and molecular experiments were conducted, for the first time, to assess if sucrose transporters are involved in the ethylene-induced increase in latex yield. These experiments were performed with mature virgin trees, at the very first tapping, to study the direct effect of ethylene, and then upon a second tapping. The PB217 rubber clone was used because it responds well to Ethrel yield stimulation.

Laticifers contain transcripts of many putative sucrose transporters

It is normally very difficult to access the pure cytoplasm of one single cell type. This is not the case for laticifers, from which the out-flowing cytoplasm (latex) can be collected by simple bark tapping. Moreover, the presence of polysomes and mRNA in the expelled latex (Coupé *et al.*, 1977; Kush *et al.*, 1990; Pujade-Renaud *et al.*, 1994; Ko *et al.*, 2003; Chow *et al.*, 2007) makes it possible to study the expression of any gene expressed in this kind of cell. Therefore, to identify the sucrose transporters expressed in laticifers, a latex-specific cDNA library was screened using four PCR-amplified homologous probes. Seven putative sucrose transporter isoforms were cloned from these cells, indicating that sucrose transporters are also encoded by a multigenic family in *H. brasiliensis*, as is the case for many other species. For example, nine sucrose transporter isoforms were identified from *Arabidopsis thaliana* (Sauer and Stolz, 1994; Barker *et al.*, 2000; Gottwald *et al.*, 2000; Ludwig *et al.*, 2000; Meyer *et al.*, 2000, 2004; Sauer *et al.*, 2004), three from tobacco (Burkle *et al.*, 1998; Ward *et al.*, 1998; Lemoine *et al.*, 1999), three from tomato (Barker *et al.*, 2000; Weise *et al.*, 2000), four from *Vitis vinifera* (Davies *et al.*, 1999; Ageorges *et al.*, 2000), two from citrus (Li *et al.*, 2003) and three from *Oryza sativa* (Scofield *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2008).

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

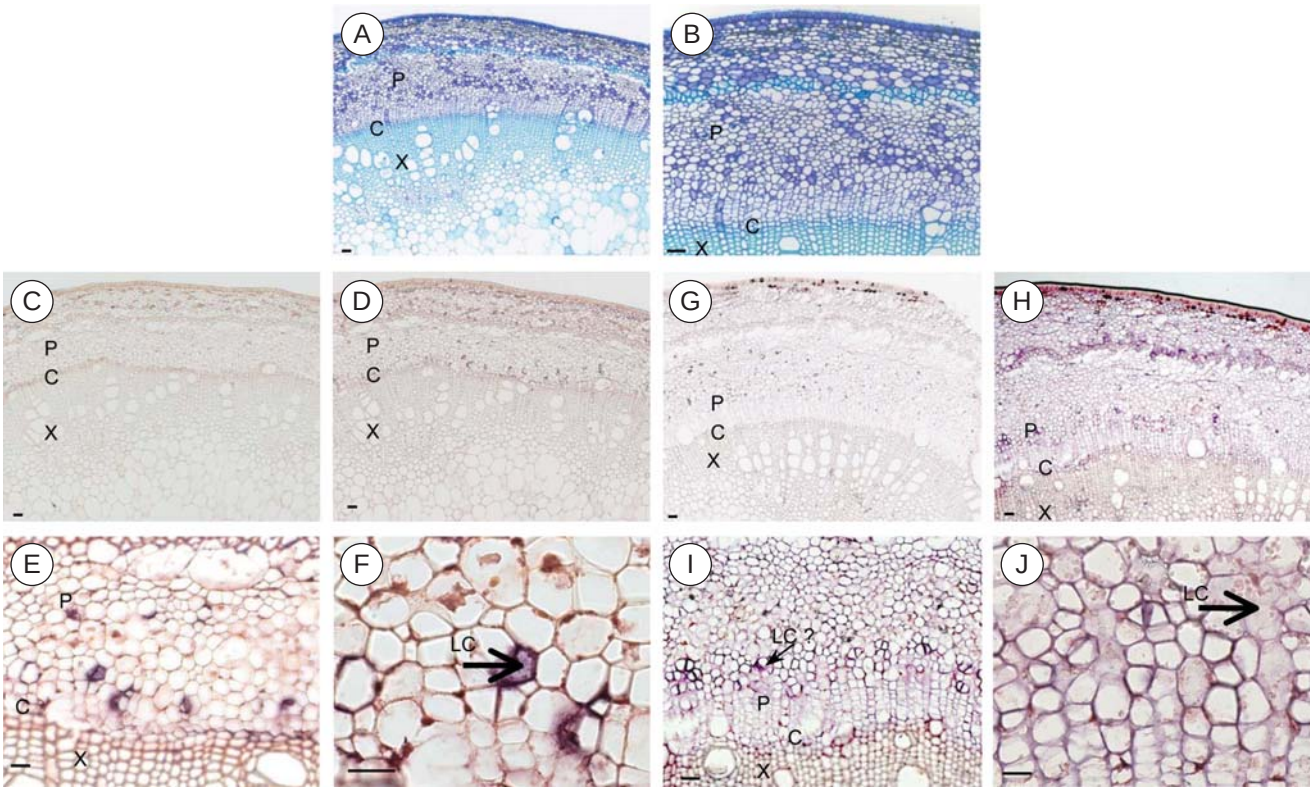


FIG. 8. *In situ* localization of *HbSUT1* and *HbSUT2A* transcripts in stems of young virgin trees. Transverse sections (12 μm thick) were obtained and hybridized with antisense probes specific for *HbSUT1* mRNA (E, F) and *HbSUT2A* mRNA (I, J); or sense probes as a negative control (*HbSUT1*: C, D; *HbSUT2A*: G, H). Positive hybridization signals are visualized by violet staining using a digoxigenin-labelled RNA immunodetection system. Other sections were stained with toluidine blue, to identify the cellular structures (A, B). Abbreviations: P, phloem; C, cambium; X, xylem; LC, laticiferous cells. Scale bar = 50 μm.

Based on their sequence homology, these sucrose transporters were found to be closely related to previously identified sucrose transporters from herbaceous as well as woody species (Lemoine, 2000; Sauer, 2007). The predicted amino-acid sequences of *Hevea* SUTs exhibited greatest identity (more than 83 %) with those of *Ricinus communis* and *Manihot esculenta*, which also belong to the Euphorbiaceae family. In addition, these sucrose transporters belong to all previously characterized groups of sucrose transporters, with two isoforms (*HbSUT1A* and *HbSUT1B*) in the SUT1 group, three (*HbSUT2A*, *HbSUT2B* and *HbSUT2C*) in the SUT2 group and two (*HbSUT4* and *HBSUT5*) in the SUT4 group.

Analysis of their basal transcript expression showed that these sucrose transporters were expressed to varying degrees in the latex, with greater expression of the SUT1 group (*HbSUT1A* and *HbSUT1B*) isoforms (Fig. 3B, C). Two isoforms of the SUT2 group (*HbSUT2A* and *HbSUT2A*) exhibited very low expression, while expression of the other SUT2 (*HbSUT2C*) and of the two SUT4 isoforms could barely be detected. On the basis of this transcript accumulation pattern, *HbSUT1A* and *HbSUT1B* may be considered as the main sucrose transporters involved in sucrose importation into the laticifers. Such a physiological role was supported by the *in situ* hybridization data, showing that these two transporters were expressed in the inner soft bark (liber) of young stems, including the young laticifers (Fig. 8).

To our knowledge, the presence of many isoforms of sucrose transporters in one single type of cell has only been reported once: this was for sieve elements with three isoforms (*LeSUT1*, *LeSUT2* and *LeSUT4*) proposed to be involved in sucrose retrieval from the apoplastic compartment (Barker *et al.*, 2000; Weise *et al.*, 2000; Kühn, 2003). Laticifers would therefore be expected to function as highly active sites of sucrose absorption.

Ethylene-induced increase in HbSUT1A *and* HbSUT2A *transcripts parallels the ethylene-induced stimulation in latex yield*

Much evidence in the literature indicates that an increase in sucrose transporter transcripts is often associated with a higher activity of the corresponding transporters, suggesting a major transcriptional regulation of these proteins (Sakr *et al.*, 1993, 1997; Chiou and Bush, 1998; Lemoine *et al.*, 1999; Decourteix *et al.*, 2006, 2008). Hence, as ethylene-stimulated latex production has been reported to occur through an increase in sugar metabolism (Tupy, 1973; Tupy and Primot, 1976; Silpi *et al.*, 2006), sugar influx (Lacrotte *et al.*, 1985) and hyperpolarization of the plasma membrane of laticifers (Bouteau *et al.*, 1999), an increased sucrose influx should be partly linked to an ethylene-induced stimulation of, at least, some of the putative cloned sucrose transporters. This should be particularly true for laticifers, as they are a very active sink cell type completely devoid of any starch reserve (Tupy, 1989).

In accordance with previously published data (Pujade-Renaud *et al.*, 1994), ethylene treatment below the tapping cut led to an

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

increase in *HbGS* expression in laticifers (Fig. 4A). This result confirmed that the ethylene signal was perceived by these cells. The expression pattern of the seven identified sucrose transporters was thus monitored on the same latex samples, using highly specific primer couples, designed from the UTR of their cDNAs (Fig. 3A). Only two transporters (*HbSUT1A*, *HbSUT2A*) were found to be, to varying degrees, significantly stimulated by ethylene. This stimulation was time-dependent as it peaked at 24 and 48 h after treatment for *HbSUT1A* and *HbSUT2A*, respectively. Note that *HbSUT1B*, which has the highest expression of any sucrose transporter isoform in the latex of untreated virgin trees, was significantly decreased when treated with ethylene. Under the same experimental conditions, the other isoforms of sucrose transporters were almost insensitive to ethylene. Taken together, these data suggest that the ethylene effect cannot be extended to all sucrose transporters initially cloned from the latex, and that the ethylene-induced sucrose influx into the laticifers (Lacrotte *et al.*, 1985) may be due, at least in part, to the ethylene stimulation of *HbSUT1A* and *HbSUT2A*. Moreover, this ethylene-induced transcript accumulation of *HbSUT1A* and *HbSUT2A* was correlated with the ethylene-stimulated latex production (Fig. 1). This potential role of *HbSUT1A* and *HbSUT2A* in ethylene-induced stimulation of latex production in virgin trees could be related to the fact that none of the sucrose transporters was found to be greatly increased during Tap2 (Fig. 4), which caused much less latex production (Fig. 1).

The ethylene effect is tissue-specific

As ethylene applied to the bark tapping area induced a pronounced increase in some SUTs in the laticifers, we verified whether a similar effect could be found in the surrounding inner liber tissues. In contrast to laticifers, no sucrose transporter was found to be significantly regulated by ethylene treatment on the first tapping (Fig. 5B–E). This lack of an ethylene effect could not be due to a failure of bark cells to perceive the ethylene signal (Fig. 5A), as ethylene did induce a marked stimulation of an ACC oxidase gene expression, which has been reported to behave as a positive marker of the response of bark tissues to ethylene treatment (Kongsawadworakul *et al.*, 2004). These data suggested that the expression of *HbSUT1A* and *HbSUT2A* induced by ethylene was limited to the laticifers, which are devoted to rubber synthesis and, thereby, latex production. A tissue-specific regulation was recently reported for *JrSUT1*, a putative plasma membrane-localized sucrose transporter, isolated from walnut tree xylem (Decourteix *et al.*, 2006). Analysis of its expression showed that *JrSUT1* was induced by freezing and thawing in xylem tissue but not in bark, indicating the occurrence of differential regulation mechanisms between these tissues.

Laticifers are considered to be apoplastic sinks which import sucrose from the phloem. The efficiency of phloem unloading is strongly related to the sink strength, which is defined as the capacity of cells to attract photoassimilates (Ho, 1988). This sink strength closely depends on the abundance and activity of plasma membrane transporters. Moreover, a close relationship between the transcript changes and the activity of sucrose transporters has been reported in some species (Chiou and Bush, 1998; Decourteix *et al.*, 2006, 2008). As ethylene induces a stimulation of two sucrose transporters in latex without having any effect on those of bark, this situation might reflect a diversion of carbon assimilates (sucrose) in favour of laticifers, where latex production is strongly stimulated by ethylene. This scenario emphasizes coordinated regulation between different sink organs of the stem.

Stimulation of HbSUT1A *and* HbSUT2A *in latex is ethylene-specific*

The transcript abundance of sucrose transporters in plants has been reported to be regulated by exogenous (Sakr *et al.*, 1993; Matsukura *et al.*, 2000; Meyer *et al.*, 2004; Decourteix *et al.*, 2006) and endogenous (Ehness and Roitsch, 1997; Chiou and Bush, 1998; Ward *et al.*, 1998; Matsukura *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2003) stimuli. We have shown here that the ethylene effect was restricted to two sucrose transporters (*HbSUT1A* and *HbSUT2A*) and correlated with ethylene-induced stimulation production. It is noteworthy that ethylene decreased *HbSUT1B* expression (Fig. 4A) but it was significantly increased by most treatments, especially JA and CPA (an auxin-like chemical; Fig. 6B).

With regard to *HbSUT1A* and *HbSUT2A*, none of the hormonal treatments induced a stimulation of their respective transcript during Tap1 (Fig. 6B, C). In addition, as wounding (nail sealing, without latex exudation) did not lead to upregulation of either *HbSUT1A* or *HbSUT2A*, it can be hypothesized that either their response to ethylene is not due to a cross-talk between the ethylene and wounding pathway, or that the concentration of endogenous ethylene, probably induced by wounding in the rubber tree bark, might be too low to induce pronounced regulation of these two genes, as compared with the application of exogenous ethylene. This differential response of sucrose transporters means that laticifers are able to adapt the transcript amount of their sugar transporters to different environmental or developmental conditions.

The present study provides insight into the physiological role that sucrose transporters play in sucrose import to laticifers, in relation to ethylene-induced stimulation of latex production. We have described the potential involvement of two sucrose transporters, *HbSUT1A* and *HbSUT2A*, in this process. Indeed, *HbSUT1A* and *HbSUT2B* were increased by ethylene and this effect was positively correlated with ethylene stimulation of latex production. Moreover, this ethylene effect is specific to laticifers, in which *cis*-polyisoprene synthesis takes place. To elucidate how the expression of these transporters is stimulated by ethylene, their respective promoters will be isolated in future experiments to determine whether they harbour an ethylene-specific *cis*-element. Because latex yield is the most important trait in breeding programmes for *H. brasiliensis*, and rubber synthesis depends on sucrose importation in laticifers, the above two sucrose transporters may constitute a useful molecular tool to underpin latex yield in this plant. Thus, single nucleotide polymorphisms (SNPs) and microsatellites will be looked for in these SUT cDNA clones to map them in the *Hevea* gene maps (Low *et al.*, 1996; Guen *et al.*, 2004) and verify if they may co-localize with latex yield and/or growth quantitative trait

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

loci. This would be of major help in rubber breeding programmes.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to the staff of the SIPH Headquarters and of the Bongo Rubber Plantation in Côte d'Ivoire (West Africa) for their logistical and technical help in the preparation and monitoring of the field experiments, as well as for allowing access to all their plant materials and laboratory facilities. We are also grateful to Drs Rémi Lemoine, Valérie Pujade-Renaud and Laurence Maurousset for critically reading earlier versions of the manuscript. This work was supported by Manufacture Française des Pneumatiques Michelin.

LITERATURE CITED

Abraham PD, Wycherley PR, Pakianathan SW. 1968. Stimulation of latex flow in *Hevea brasiliensis* of 4-amino-3,5,6-trichloropicolinic acid and 2-chloroethane-phosphonic acid. *Journal of Rubber Research* **20**: 291–305.

Ageorges A, Issalya N, Picaudb S, Delrot S, Romieu C. 2000. Identification and functional expression in yeast of a grape berry sucrose carrier. *Plant Physiology and Biochemistry* **38**: 177–185.

Amalou Z, Bangratz J, Chrestin H. 1992. Ethrel® (ethylene releaser) induced increase in the adenylate pool and transtonoplast pH within latex cells. *Plant Physiology* **98**: 1270–1276.

d'Auzac J. 1964. Mise en evidence de la glycolyse et de ses relations avec la biosynthèse du caoutchouc au sein du latex d' *Hevea brasiliensis*. *Revue Générale des Caoutchoucs et Plastiques* **41**: 1831–1834.

d'Auzac J, Ribaillier D. 1969. L'ethylène, un nouveau stimulant de la production de latex chez l'Hevea brasiliensis. *Compte-rendus de l' Acadadémie des Sciences Série D* **268**: 3046–3049.

Barker L, Kuhn C, Weise A, *et al*. 2000. SUT2, a putative sucrose sensor in sieve elements. *Plant Cell* **12**: 1153–1164.

Barth I, Meyer S, Sauer N. 2003. PmSUC3: characterization of a SUT2/SUC3-type sucrose transporter from *Plantago major*. *Plant Cell* **15**: 1375–1385.

Baud S, Wuilleme S, Lemoine R, *et al*. 2005. The AtSUC5 sucrose transporter specifically expressed in the endosperm is involved in early seed development in Arabidopsis. *Plant Journal* **43**: 824–836.

Bouteau F, Lacrotte R, Cornel D, *et al*. 1991. Electrogenic active proton pumps in *Hevea brasiliensis* laticiferous cells: its role in activating sucrose/H+ and glucose/H+ symports at the plasma membrane. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* **26**: 223–236.

Bouteau F, Bousquet U, Lacrotte R, Cornel D, Monestiez M, Rona JP. 1992. Sucrose/H+ and glucose/H+ symports at the plasma membrane of laticiferous cells and protoplasts of Hevea brasiliensis. *Indian Journal of Natural Rubber Research* **5**: 25–37.

Bouteau F, Dellis O, Bousquet U, Rona JP. 1999. Evidence of multiple sugar uptake across the plasma membrane of laticifer protoplasts from *Hevea*. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* **48**: 135–139.

Brunel N, Leduc N, Poupard P, Simoneau P, Mauget J-C, Viémont J-D. 2002. KNAP2, a class I KN1-like gene is a negative marker of bud growth potential in apple trees (*Malus domestica* [L.] Borkh.). *Journal of Experimental Botany* **53**: 2143–2149.

Burkle L, Hibberd JM, Quick WP, Kuhn C, Hirner B, Frommer WB. 1998. The H + -sucrose cotransporter NtSUT1 is essential for sugar export from tobacco leaves. *Plant Physiology* **118**: 59–68.

Buttery BR, Boatman SG. 1966. Manometric measurement of turgor pressures in laticiferous phloem tissues. *Journal of Experimental Botany* **17**: 283–296.

Chang S, Puryear J, Cairney J. 1993. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Molecular Biology Reporter* **11**: 113–116.

Chincinska IA, Liesche J, Krügel U, Michalska J, Geigenberger P, Grimm B, Kühn C. 2008. Sucrose Transporter StSUT4 from Potato Affects Flowering, Tuberization, and Shade Avoidance Response. *Plant Physiology* **146**: 515–528.

Chiou TJ, Bush DR. 1998. Sucrose is a signal molecule in assimilate partitioning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 4784–4788.

Chow K-S, Wan K-L, Isa MNM, *et al*. 2007. Insights into rubber biosynthesis from transcriptome analysis of *Hevea brasiliensis* latex. *Journal of Experimental Botany* **58**: 2429–2440.

Coupé M, Chrestin H. 1989. Physico-chemical and biochemical mechanisms of the hormonal (ethylene) stimulation: early biochemical events induced, in *Hevea* latex, by hormonal bark stimulation. In: d'Auzac J, Jacob JL, Chrestin H. eds. *Physiology of rubber tree latex*. Boca Raton, FL: CRC Press Inc, 295–319.

Davies C, Wolf T, Robinson SP. 1999. Three putative sucrose transporters are differentially expressed in grapevine tissue. *Plant Science* **147**: 93–100.

Decourteix M, Alves G, Brunel N, *et al*. 2006. JrSUT1, a putative xylem sucrose transporter, could mediate sucrose influx into xylem parenchyma cells and be up-regulated by freeze-thaw cycles over the autumn-winter period in walnut tree (*Juglans regia* L.). *Plant, Cell and Environment* **29**: 36–47.

Decourteix M, Alves G, Bonhomme M, *et al*. 2008. Sucrose (JrSUT1) and hexose (JrHT1 and JrHT2) transporters in walnut xylem parenchyma cells: their potential role in early events of growth resumption. *Tree Physiology* **28**: 214–224.

Duval FD, Renard M, Jaquinod M, Biou V, Montrichard F, Macherel D. 2002. Differential expression and functional analysis of three calmodulin isoforms in germinating pea (*Pisum sativum* L.) seeds. *Plant Journal* **32**: 481–493.

Ehness R, Roitsch T. 1997. Co-ordinated induction of mRNAs for extracellular invertase and a glucose transporter in *Chenopodium rubrum* by cytokinins. *Plant Journal* **11**: 539–548.

Endler A, Meyer S, Schelbert S, *et al*. 2006. Identification of a vacuolar sucrose transporter in barley and Arabidopsis mesophyll cells by a tonoplast proteomic approach. *Plant Physiology* **141**: 196–207.

Eschbach J-M, Tupy J, Lacrotte R. 1986. Photosynthate allocation and productivity of latex vessels in *Hevea brasiliensis*. *Biologia Plantarum* **28**: 321–328.

de Faÿ E, Jacob J-L. 1989. Anatomical organization of the laticiferous system in the bark. In: d'Auzac J, Jacob JL, Chrestin H eds. *Physiology of rubber tree latex*. Boca Raton, FL: CRC Press Inc, 3–14.

Gohet E. 1996. La production de latex par *Hevea brasiliensis*, relations avec la croissance. Influence de différents facteurs: origine clonale, stimulation hormonale, réserves hydrocarbonées. Thesis. pp. 343. Montpellier: Université Montpellier II.

Gohet E, Kouadio D, Prévôt JC, *et al*. 1997. Relation between clone type, latex sucrose content and the occurence of tapping panel dryness in Hevea brasiliensis. In: *IRRDB 1997. Tapping Panel Dryness*. Montpellier: CIRAD-CP, [14] p. IRRDB Tapping Panel Dryness Workshop, 1997-04-29/1997-04-30, (Danzhou, Chine).

Gohet E, Chantuma P, Lacote R, *et al*. 2003. Latex clonal typology of *Hevea brasiliensis*. Physiological modelling of yield potential and clonal response to Ethephon stimulation. In: *IRRDB Workshop on Exploitation Technology*, Kottayam, India15–18 December 2003, s.l.: s.n., 14 p.. IRRDB Workshop on Exploitation Technology, 2003-12-15/2003-12-18, Kottayam, Inde.

Gomez JB. 1976. Comparative ultracytology of young and mature latex vessels in *Hevea brasiliensis*. In: *Proceedings of the International Rubber Conference*. Kuala Lumpur: Rubber Research Institute, 43–164.

Gomez JB, Moir GFJ. 1979. *The ultracytology of latex vessels in* Hevea brasiliensis. Malaysian Rubber Research and Development Board, Monograph no. 4, Kuala Lumpur.

Gottwald JR, Krysan PJ, Young JC, Evert RF, Sussman MR. 2000. Genetic evidence for the *in planta* role of phloem-specific plasma membrane sucrose transporters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 13979–13984.

Guen V, Lespinasse D, Oliver G, Rodier-Goud M, Pinard F, Seguin M. 2004. Molecular mapping of genes conferring field resistance to South American Leaf Blight (*Microcyclus ulei*) in rubber tree. *Theoretical and Applied Genetics* **108**: 160–167.

Hackel A, Schauer N, Carrari F, Fernie AR, Grimm B, Kuhn C. 2006. Sucrose transporter LeSUT1 and LeSUT2 inhibition affects tomato fruit development in different ways. *Plant Journal* **45**: 180–192.

Harms K, Wöhner RV, Schulz B, Frommer WB. 1994. Isolation and characterization of P-type H + -ATPase genes from potato. *Plant Molecular Biology* **26**: 1045–1053.

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

Hébant C, 1981. Ontogénie des laticifères du système primaire de l' *Hevea brasiliensis*, une etude ultra structurale et cytochimique. *Canadian Journal of Botany* **59**: 974–985.

Hébant C, de Faÿ E. 1980. Functional organizationof the bark of *Hevea brasiliensis* (rubber tree): a structural and histoenzymological study. *Pflanzenphysiology* **97**: 391–398.

Hepper CM, Audley BG. 1969. The biosynthesis of rubber from hydroxy-methyl-glutaryl coenzyme A in *Hevea brasiliensis* latex. *Biochemistry Journal* **114**: 379.

Ho L. 1988. Metabolism and compartmentation of imported sugars in sink organs in relation to sink strength. *Plant Physiology Plant Molecular Biology* **39**: 355–378.

Jacob JL, Serres E, Prévôt JC, *et al*. 1988. Development of *Hevea* latex diagnosis. *Agritrop* **12**: 97–115.

Jacob JL, Prévôt JC, Roussel D, *et al*. 1989. *Hevea brasiliensis* yield-limiting factors, latex physiological parameters, latex diagnosis and clonal typology. In: d'Auzac J, Jacob JL, Chrestin H. eds. *Physiology of rubber tree latex*. Boca Raton, FL: CRC Press Inc, 345–382.

Juergensen K, Scholz-Starke J, Sauer N, Hess P, Bel AJK, Grundler FM. 2003. The companion cell-specific *Arabidopsis* disaccharide carrier AtSUC2 is expressed in nematode-induced syncytia. *Plant Physiology* **131**: 61–69.

Ko J, Chow KS, Han K. 2003. Transcriptome analysis reveals novel features of the molecular events occurring in the laticifers of *Hevea brasiliensis* (para rubber tree). *Plant Molecular Biology* **53**: 479–492.

Kongsawadworakul P, Peret B, Pellegrin F, Nandris D, Chrestin H. 2004. The ethylene/cyanide metabolic crossroad in *Hevea* bark and latex. In: *Proceedings of IRRDB Seminar on Hevea Physiology and Breeding*. Kunming, China, 331–345.

Kühn C. 2003. A comparison of the sucrose transporter systems of different plant species. *Plant Biology* **5**: 215–232.

Kush A, Goyvaerts E, Chye ML, Chua NH. 1990. Laticifer-specific gene expression in *Hevea brasiliensis* (rubber tree). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**: 1787–1790.

Lacrotte R, Sype HVd, Chrestin H. 1985. Influence de l'éthylène sur l'utilisation du saccharose exogène par les laticifères d' *Hevea brasiliensis*. Proposition d'un mécanisme d'action. *Physiologie Vegetale* **23**: 187–198.

Lemoine R. 2000. Sucrose transporters in plants: update on function and structure. *Biochimica et Biophysica Acta, Biomembranes* **1465**: 246–262.

Lemoine R, Burkle L, Barker L, *et al*. 1999. Identification of a pollen-specific sucrose transporter-like protein NtSUT3 from tobacco. *FEBS Letters* **454**: 325–330.

Lerchl J, König S, Zrenner R, Sonnewald U. 1995. Molecular cloning, characterization and expression analysis of isoforms encoding tonoplast-bound proton-translocating inorganic pyrophosphatase in tobacco. *Plant Molecular Biology* **29**: 833–840.

Li C, Shi J, Weiss D, Goldschmidt EE. 2003. Sugars regulate sucrose transporter gene expression in citrus. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **306**: 402–407.

Low FC, Atan S, Hafsah Jaafar Tan H. 1996. Recent advances in the development of molecular markers for *Hevea* studies. *Journal of Natural Rubber Research* **11**: 32–44.

Ludwig A, Stolz J, Sauer N. 2000. Plant sucrose-H+ symporters mediate the transport of vitamin H. *Plant Journal* **24**: 503–509.

Marger MD, Saier MH. 1993. A major superfamily of transmembranes facilitators that catalyse uniport, symport and antiport. *Trends in Biochemical Sciences* **18**: 13–20.

Matsukura C, Saitoh T, Hirose T, Ohsugi R, Perata P, Yamaguchi J. 2000. Sugar uptake and transport in rice embryo. Expression of companion cell-specific sucrose transporter (OsSUT1) induced by sugar and light. *Plant Physiology* **124**: 85–93.

Meyer S, Melzer M, Truernit E, *et al*. 2000. AtSUC3, a gene encoding a new Arabidopsis sucrose transporter, is expressed in cells adjacent to the vascular tissue and in a carpel cell layer. *Plant Journal* **24**: 869–882.

Meyer S, Lauterbach C, Niedermeier M, Barth I, Sjolund RD, Sauer N. 2004. Wounding enhances expression of AtSUC3, a sucrose transporter from Arabidopsis sieve elements and sink tissues. *Plant Physiology* **134**: 684–693.

Morey KJ, Ortega JL, Sengupta-Gopalan C. 2002. Cytosolic glutamine synthetase in soybean is encoded by a multigene family, and the members are regulated in an organ-specific and developmental manner. *Plant Physiology* **128**: 182–193.

Poupard P, Brunel N, Leduc N, Viémont JD, Strullu DG, Simoneau P. 2001. Expression of a Bet v1 homologue gene encoding a PR 10 protein in birch roots: induction by auxin and localization of the transcripts by *in situ* hybridization. *Australian Journal of Plant Physiology* **28**: 57–63.

Pujade-Renaud V, Clement A, Perrot-Rechenmann C, *et al*. 1994. Ethylene-induced increase in glutamine synthetase activity and mRNA levels in *Hevea brasiliensis* latex cells. *Plant Physiology* **105**: 127–132.

Pujade-Renaud V, Perrot-Rechenmann C, Chrestin H, Lacrotte R, Guern J. 1997. Characterization of a full-length cDNA clone encoding glutamine synthetase from rubber tree latex. *Plant Physiology and Biochemistry (Paris)* **35**: 85–93.

Roblin G, Sakr S, Bonmort J, Delrot S. 1998. Regulation of a plant plasma membrane sucrose transporter by phosphorylation. *FEBS Letters* **424**: 165–168.

Sakr S, Lemoine R, Gaillard C, Delrot S. 1993. Effect of cutting on solute uptake by plasma membrane vesicles from sugar beet (*Beta vulgaris* L.) leaves. *Plant Physiology* **103**: 49–58.

Sakr S, Noubahni M, Bourbouloux A, *et al*. 1997. Cutting, ageing and expression of plant membrane transporters. *Biochimica et Biophysica Acta* **1330**: 207–216.

Sakr S, Alves G, Morillon R, *et al*. 2003. Plasma membrane aquaporins are involved in winter embolism recovery in walnut tree. *Plant Physiology* **133**: 630–641.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sauer N. 2007. Molecular physiology of higher plant sucrose transporters. *FEBS Letters* **581**: 2309–2317.

Sauer N, Stolz J. 1994. SUC1 and SUC2: two sucrose transporters from Arabidopsis thaliana; expression and characterization in baker's yeast and identification of the histidine-tagged protein. *Plant Journal* **6**: 67–77.

Sauer N, Ludwig A, Knoblauch A, Rothe P, Gahrtz M, Klebl F. 2004. AtSUC8 and AtSUC9 encode functional sucrose transporters, but the closely related AtSUC6 and AtSUC7 genes encode aberrant proteins in different Arabidopsis ecotypes. *Plant Journal* **40**: 120–130.

Scofield GN, Aoki N, Hirose T, Takano M, Jenkins CLD, Furbank RT. 2007. The role of the sucrose transporter, OsSUT1, in germination and early seedling growth and development of rice plants. *Journal of Experimental Botany* **58**: 483–495.

Schneidereit A, Imlau A, Sauer N. 2008. Conserved *cis* -regulatory elements for DNA-binding-with-one-finger and homeo-domain-leucine-zipper transcription factors regulate companion cell-specific expression of the *Arabidopsis thaliana SUCROSE TRANSPORTER 2* gene. *Planta* **228**: 651–662.

Silpi U, Chantuma P, Kasemsap P, *et al*. 2006. Sucrose and metabolism distribution patterns in the latices of three *Hevea brasiliensis* clones: effects of tapping and stimulation on the tree trunk. *Journal of Rubber Research* **9**: 115–131.

Silpi U, Lacointe A, Kasempsap P, *et al*. 2007. Carbohydrate reserves as a competing sink: evidence from tapping rubber trees. *Tree Physiology* **27**: 881–889.

Sookmark U, Pujade-Renaud V, Chrestin H, *et al*. 2002. Characterization of polypeptides accumulated in the latex cytosol of rubber trees affected by the tapping panel dryness syndrome. *Plant and Cell Physiology* **43**: 1323–1333.

Sun AJ, Xu HL, Gong WK, *et al*. 2008. Cloning and expression analysis of rice sucrose transporter genes OsSUT2M and OsSUT5Z. *Journal of Integrative Plant Biology* **50**: 62–75.

Tupy J. 1973. The level and distribution pattern of latex sucrose along the trunk of *Hevea brasiliensis* Mull.Arg. as affected by the sink region induced by latex tapping. *Physiologie Vegetale* **11**: 1–11.

Tupy J, Primot L. 1976. Control of carbohydrate metabolism by ethylene in latex vessels of *Hevea brasiliensis* Muel. Arg. in relation to rubber production. *Biologia Plantarum* **18**: 373–383.

Vaughn MW, Harrington GN, Bush DR. 2002. Sucrose-mediated transcriptional regulation of sucrose symporter activity in the phloem. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**: 10876–10880.

Ward JM, Kühn C, Tegeder M, Frommer WB. 1998. Sucrose transport in higher plants. *International Review of Cytology-A Survey Of Cell Biology* **178**: 41–71.

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

Weise A, Barker L, Kuhn C, *et al*. 2000. A new subfamily of sucrose transporters, SUT4, with low affinity/high capacity localized in enucleate sieve elements of plants. *Plant Cell* **12**: 1345–1355.

Yang J, Huang D, Liu S, Tang C. 2007. Molecular cloning and sequence analysis of six sucrose transporter genes from *Hevea brasiliensis* (para rubber tree). *Re Dai Zuo Wu Xue Bao* **28**: 32–38.

APPENDIX

Accession numbers of sucrose transporter sequences presented in Fig. 2: AbSUT1 (*Asarina barclaiana*; AAF04294), AgSUT3 (*Apium graveolens*; ABB89051), AmSUT1 (*Alonsoa meridionalis*; AAF04295), AtSUC1 (*Arabidopsis thaliana*; At1g71880), AtSUC2 (*Arabidopsis thaliana*; At1g22710), AtSUC3 (*Arabidopsis thaliana*; At2g02860), AtSUC4 (*Arabidopsis thaliana*; At1g09960), AtSUC5 (*Arabidopsis thaliana*; At1g71890), AtSUC6 (*Arabidopsis thaliana*; At5g43610), AtSUC7 (*Arabidopsis thaliana*; At1g66570), AtSUC8 (*Arabidopsis thaliana*; At2g14670), AtSUC9 (*Arabidopsis thaliana*; At5g06170), BoSUC1 (*Brassica oleracea*; AAL58071), BoSUC2 (*Brassica oleracea*; AAL58072), BoSUT1 (*Bambusa oldhamii*; AAY43226), CsSUT2 (*Citrus sinensis*; AAM29153), DgSUT4 (*Datisca glomerata*; CAG70682), DcSUT1 (*Daucus carota*; BAA89458), EeSUCx (*Euphorbia esula*; AAF65765), EuSUT2 (*Eucommia ulmoides*; AAX49396), HbSUT1A (*Hevea brasiliensis*; DQ985466), HbSUT1B (*Hevea brasiliensis*; AM492537), HbSUT2A (*Hevea brasiliensis*; ABJ51934), HbSUT2B (*Hevea brasiliensis*; ABJ51932), HbSUT2C (*Hevea brasiliensis*; AM491808), HbSUT4 (*Hevea brasiliensis*; EF067335), HbSUT5 (*Hevea brasiliensis*; ABK60189), HvSUT1 (*Hordeum vulgare*; CAB75882), HvSUT2 (*Hordeum vulgare*; CAB75881), JrSUT1 (*Juglans regia*; AAU11810), LeSUT2 (*Lycopersicum esculentum*; AAG12987), LeSUT4 (*Lycopersicum esculentum*; AAG09270), LjSUT4 (*Lotus japonicus*; CAD61275), MdSUT1 (*Malus domestica*; AAR17700), MeSUT2 (*Manihot esculenta*; ABA08445), MeSUT4 (*Manihot esculenta*; ABA08443), NtSUT1 (*Nicotiana tabacum*; X82276), NtSUT3 (*Nicotiana tabacum*; AAD34610), OsSUT1 (*Oryza sativa*; AAF90181), OsSUT2 (*Oryza sativa*; AAN15219), OsSUT3 (*Oryza sativa*; BAB68368), OsSUT4 (*Oryza sativa*; BAC67164), OsSUC4 (*Oryza sativa*; Q2QLI1), OsSUT5 (*Oryza sativa*; BAC67165), PmSUC1 (*Plantago major*; CAI59556), PmSUC2 (*Plantago major*; X75764), PmSUC3 (*Plantago major*; CAD58887), PtSUT1-1 (*Populus tremula* × *Populus tremuloides*; CAJ33718), PsSUT1 (*Pisum sativum*; AAD41024), RcSCR1 (*Ricinus communis*; CAA83436), SdSUT2 (*Solanum demissum*; AAT40489), ShSUT1 (*Saccharum hybridum*; AAV41028), SoSUT1 (*Spinacea oleracea*; Q03411), StSUT1 (*Solanum tuberosum*; CAA48915), StSUT4 (*Solanum tuberosum*; AAG25923), TaSUT1A (*Triticum aestivum*; AAM13408), TaSUT1B (*Triticum aestivum*; AAM13409), TaSUT1D (*Triticum aestivum*; AAM13410), VfSUCx (*Vicia faba*; CAB07811), VvSUCy (*Vitis vinifera*; AAL32020), VvSUC11 (*Vitis vinifera*; AAF08329), VvSUC12 (*Vitis vinifera*; AAF08330), VvSUC27 (*Vitis vinifera*; AAF08331), ZmSUT1 (*Zea mays*; BAA83501), ZmSUT2 (*Zea mays*; AAS91375), ZmSUT4 (*Zea mays*; AAT51689).

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

Cette première partie du travail nous a permis de démontrer au niveau moléculaire, l'existence de plusieurs transporteurs putatifs de sucres (saccharose et hexoses) dans les cellules laticifères de l'hévéa. En effet, sept isoformes de transporteurs de saccharose et une isoforme de transporteur d'hexoses ont été isolées à partir d'une banque d'ADNc des cellules laticifères. Les transporteurs de saccharose sont repartis dans les trois groupes de transporteurs de saccharose SUT1 (groupe I), SUT2 (groupe III), SUT4 (groupe IV ; Sauer, 2007). L'implication potentielle de ces transporteurs de saccharose dans la production de latex des arbres vierges semble être limitée à deux isoformes *HbSUT1A* et *HbSUT2A*, dont l'expression augmente fortement dans le latex, en réponse à la stimulation de la production par l'éthylène. L'expression de *HbSUT1B* est légèrement réprimée par l'éthylène, alors que celle des cinq autres transporteurs ne semble pas être significativement modulée après un tel traitement. D'autre part, cette réponse de *HbSUT1A* et *HbSUT2A* semble être spécifique de l'éthylène, car aucune réponse similaire n'a été constatée en présence d'autres traitements (hormones, blessure). L'ensemble de ces données permettent d'envisager, pour la première fois, le rôle potentiel de deux transporteurs de saccharose, *HbSUT1A* et *HbSUT2A*, dans l'influx du saccharose au sein des cellules laticifères, en relation avec la stimulation de production de latex par l'éthylène chez les arbres vierges (PB217).

Afin de valider la relation entre transporteurs de sucres et stimulation de la production de latex par l'éthylène, l'expression de ces sept transporteurs putatifs de saccharose et du transporteur d'hexoses a été étudiée chez des arbres en exploitation. Il s'agissait d'arbres exploités depuis 2 ans et mis au repos 2 mois avant l'expérimentation. Les arbres exploités se caractérisent par un métabolisme très actif et une biosynthèse du caoutchouc élevée (Silpi *et al.*, 2007). Par conséquent, ces arbres constituent un modèle très pertinent pour étudier l'expression des transporteurs de sucres dans des conditions de production intense. De plus, l'étude a été menée conjointement sur deux clones d'hévéa (PB217 et PB260), principalement choisis pour leurs métabolismes contrastés et leurs réponses différentielles à l'éthylène. Sur la base du DL, le clone PB217 se caractérise par un métabolisme moyennement actif mais dont la production est fortement stimulée par l'éthylène. Quant au clone PB260, il a un métabolisme très actif avec une forte production, qui est faiblement augmentée en condition de stimulation éthylénique (Jacob, 1995d ; Gohet *et al.*, 2003). L'intérêt de mener conjointement cette étude sur ces deux clones était de comparer les profils d'expression des différents transporteurs dans deux situations de production différentes ; et ainsi de pouvoir éventuellement relier ces différences de production à des différences d'expression d'une ou de plusieurs isoformes de transporteurs de sucres. Dans le cadre de ce travail, notre principal but

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

était de vérifier si une différence de régulation des transporteurs de sucres pouvait au moins en partie rendre compte des disparités de production entre les deux clones PB217 et PB260. Les résultats obtenus ont été formalisés sous forme d'une publication intitulée « *HbSUT1B* and *HbHXT1* : potential role of two sugar transporters in ethylene-stimulated latex production in exploited rubber tree », qui sera prochainement soumise au journal Tree Physiology.

Les résultats de cette étude nous ont amené à émettre l'hypothèse selon laquelle l'isoforme du transporteur putatif de saccharose (*HbSUT1B)* et celle du transporteur d'hexoses (*HbHXT1*) seraient impliquées dans la production de latex chez les arbres exploités. Par conséquent, les connaissances acquises sur l'expression et le rôle potentiel de *HbSUT1B* dans la production de latex chez les arbres stimulés ont été complétées par un travail qui a fait l'objet d'une publication acceptée dans le *Journal of Rubber Research* en 2009.

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

ORIGINAL ARTICLE

HbSUT1B and *HbHXT1*: potential role of two sugar transporters in ethylene-stimulated latex production in exploited rubber tree

Anaïs Dusotoit-Coucaud[(1)], Nicole Brunel[(1)], Valérie Pujade-Renaud[(2,1)], Panida Kongsawadworakul[(3)], Unshira Viboonjun[(3)], Hervé Chrestin[(3,4)], Soulaïman Sakr[(1,5)*]

(1) UMR 547 PIAF, INRA, Université Blaise Pascal, 24 avenue des Landais, 63177 Aubière Cedex, France.

(2) Centre International de Recherche et d'Aide au Développement

(3) Department of Plant Science, Faculty of Science, Mahidol University, Rama 6 Road, Bangkok 10400, Thailand.

(4) Institut de Recherche pour le Développement (IRD), UR060/CEFE-CNRS, 1029 route de Mende, 34032, Montpellier, France.

(5) Agrocampus Ouest, Centre d'Angers, UMR SAGAH, IFR QUASAV 149, 2 rue le Nôtre, 49045 Angers Cedex, France.

Running title: sugar transporters and latex production

* Corresponding author: Soulaïman Sakr

Tel.: +33 (0)2 41 22 54 24;

E-mail: soulaiman.sakr@agrocampus-ouest.fr

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

Introduction

Hevea brasiliensis is a tree of the Euphorbiaceae family, a native of the Amazonian region but now cultivated in numerous tropical regions worldwide (South America, Africa, Southeast Asia). This tree produces natural rubber, used in many industrial sectors such as tire manufacturing. Natural rubber biosynthesis occurs in the latex (cytoplasm) in highly specialized latex cells. These cells are rhythmically differentiated from the cambium and arranged in concentric layers, isolated and independent (Hébant and de Faÿ, 1980; de Faÿ and Jacob, 1989). Their cytoplasm contains numerous rubber particles in suspension, which represent up to 90% of the latex dry weight. During tapping, the latex (except for the nucleus and mitochondria) is expelled by turgor pressure (Gomez, 1976; Gomez and Moir, 1979), partially draining the latex from the bark area below the tapping cut. Latex cells then have to completely regenerate their cytoplasm between two consecutive tappings (from three to six days, depending on the plantation).

The rubber biosynthesispathway could may follow two different pathways: (i) the mevalonate-dependent pathway that has been well characterized for a long time (Bandurski and Heals, 1957; Hepper and Audley, 1969), or (ii) the MEP (1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate/2-C-methyl-D-erythritol)-dependent pathway that was recently proposed (Ko *et al.*, 2003) but that is strongly questioned today (Sando *et al.*, 2008). Sucrose is the unique precursor of these two pathways (d'Auzac, 1964, Chow *et al.*, 2007), and its import into latex cells may represent a limiting factor for rubber production.

Latex cells are heterotrophic and must import exogenous photoassimilates to meet their needs for carbon and energy (Tupy, 1973b; d'Auzac, Jacob and Chrestin, 1989; Eschbach*et al.*, 1986; Silpi *et al.*, 2007). Data from cytological studies (Hébant, 1981; de Faÿ *et al.*, 1989) and electrophysiological investigations (Bouteau *et al.*, 1991, 1992, 1999) lend support to the hypothesis of the presence of energized sugar/H^+ plasma membrane symporters. This hypothesis was very recently confirmed by the cloning of seven putative sucrose transporters (SUTs) from a latex cDNA library (Dusotoit-Coucaud *et al.*, 2009b; Yang *et al.*, direct submission).

Since the first sucrose transporter isolation was achieved (Riesmeier *et al.*, 1993 ; Sauer and Tanner, 1989), many sucrose transporters have been isolated from herbaceous and woody species. Sugar transporters usually belong to the Major Facilitative Superfamily (MFS; Marger and Saier, 1993), and are encoded by multigenic families (Büttner and Sauer, 2000; Sauer, 2007). According to their localization and function, they are classified into four

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

groups: I, II (previously SUT1), III (previously SUT2) and IV (previously SUT4) (Sauer, 2007). The seven putative sucrose transporters identified from the rubber tree (*Hevea brasiliensis* Sucrose Transporter, HbSUTs) are distributed into three groups: group II for *HbSUT1A* and *HbSUT1B*, group III for *HBSUT2A*, *HbSUT2B* and *HbSUT2C*, and group IV for *HbSUT4* and *HbSUT5*. All these putative transporters were found to be expressed in source and sink organs, but only two isoforms, *HbSUT1A* and *HbSUT2A*, exhibit an ethylene mediated up-regulation, which is tissue- and ethylene-specific (Dusotoit-Coucaud *et al.*, 2009b). All these data suggest that *HbSUT1A* and *HbSUT2A* play a role in supplying latex cells with sucrose, favorable for ethylene-enhanced latex production in virgin rubber trees. However, no information is yet available on their potential roles in exploited trees.

Sugar transporters are involved in many physiological processes in source and sink organs and at different stages of development. For example, in sink organs, *AtSUC5* (*Arabidopsis thaliana* Sucrose Carrier 5), found in the endosperm, is required for sucrose supply during early seed development (Baud *et al.*, 2005), *RcSCR1* (*Ricinus communis* Sucrose Carrier 1) is responsible for sucrose recovery in the growing hypocotyls (Eisenbarth and Weig, 2005), and *AtSTP11* (Arabidopsis *thaliana* Sugar transporter 11), specifically expressed in growing pollen tubes, is involved in its feeding with sugar. In rubber trees, sucrose is the main form of sugar transported to sink latex cells in which sucrose is used for rubber biosynthesis and latex regeneration, as well as for osmoregulation (Jacob *et al.*, 1989). Despite its role in latex cells, no information exists about the molecular regulation of sucrose transporters in exploited trees.

To answer this question, this work was conducted in parallel on two cultivated *Hevea brasiliensis* clones: PB217 and PB260. Based on their Latex Diagnosis (LD) that estimates the physiological status of latex production at any given moment, these clones were shown to display contrasted metabolic features (Gohet *et al.*, 2003). Latex Diagnosis relies on the simultaneous measurement of four parameters in relation to the metabolic activity of latex cells: dry weight, sucrose content (SUC), inorganic phosphorus concentration (Pi) and the reduced thiol concentration in latex (Jacob, 1982, 1988; Chrestin, 1984; Escbach *et al.*, 1986, Tupy, 1989; Lacrotte, 1991). This characterization has led to the concept of clonal types in relation to the metabolic functioning of latex (Jacob *et al.*, 1995; Gohet *et al.*, 1996; Gohet *et al.*, 2003). The PB260 clone displays very active metabolism but an intermediate sugar loading capacity. This clone has high production yield without any stimulation, which is weakly increased after ethylene treatment. In contrast to PB260, the PB217 clone has medium or low metabolic activity, but a very high sugar loading capacity. It is characterized as a low producer when not stimulated, but an excellent producer after ethylene treatment. By

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

combining both approaches on exploited trees and on two contrasted clones, our goal was to better understand the sugar transporter role in latex cells in relation to latex production.

In this study, we showed that among the seven isoforms of sucrose transporters cloned in the rubber tree, only one, *HbSUT1B*, was significantly regulated by ethylene in the two clones studied, both in latex and in bark. However, this regulation is clone-dependent and may account for their difference in ethylene response. Moreover, the expression of *HbSUT1B* seems to be related to rubber production, and this isoform might be a potential candidate for a production marker. *HbHXT1* has been revealed to be highly ethylene-induced in PB217 latex and likely to participate in ethylene-enhanced latex production. These findings are discussed in relation to ethylene-modulated latex production and suggest the importance of these transporters in functioning latex cells, a new model of sink organs

Material and methods

Plant material

The field experiments were carried out at the Bongo/SAPH plantation (Côte d'Ivoire). The latex and bark samples were collected from the trunk of mature PB217 or PB260 rubber trees (about 10 years old), exploited for two years, but left to rest the last three months (no tapping, no stimulation). The latex samples were collected as previously described by Pujade-Renaud *et al.* (1994). Briefly, after discarding the first 20 drops, the latex samples were collected as a mix of 2 ml from three trees per treatment in an equal volume of 2X fixation buffer. The bark samples were collected 5 cm below the tapping cut. Latex and bark samples were immediately deep-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C.

Rejuvenated rubber trees (back cut six months earlier) grown in a controlled environment chamber (CPN, Michelin Group, Clermont-Ferrand, France) were used to analyze sucrose transporter gene expression patterns in different organs (mature leaves, bark and xylem) and for *in situ* hybridization (stems). The culture conditions of these young hevea trees were as follows: 12 h daylight at 27-30°C, with 70 ± 10% relative humidity, 40 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ (day), and at 25°C, with 90% relative humidity (night). Each pot was connected to a watering system and sprayed twice daily for 3 minutes.

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

Field experiment

Seven batches of three exploited mature trees were set up in a similar way, as previously described by Pujade-Renaud *et al.* (1994) and Sookmark *et al.* (2002): two as a control (unstimulated) and five treated with 5% Ethrel® on a 1-cm wide, slightly scraped bark band, just beneath the half spiral (S/2) tapping cut, for 4, 8, 16, 24 and 40 hours, respectively, before the first sampling. The latex and bark samples were collected at the first tapping (Tap1) on the same day and at the same hour. After three days of rest (with neither stimulation nor tapping), latex and bark samples from the same trees were collected again and analyzed as the second tapping (Tap2).

RNA extraction

Total RNA extraction from latex was performed according to the method adapted from Pujade-Renaud *et al.* (1994, 1997) and developed by Sookmark *et al.* (2002). Total inner bark RNA extraction of mature trees was performed using the cesium chloride cushion method, adapted from Sambrook *et al.* (1989), with approximately 2 g of inner bark ground in liquid nitrogen.

Quantification of sucrose transporter transcripts by Real-Time RT-PCR

After treatment with DNase I, 2 µg of total RNA were used as template in the first strand cDNA synthesis reaction according to the manufacturer's instructions (SuperScript-III, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Real-time PCR was carried out using the generated cDNA as target template, specific primers (Dusotoit-Coucaud *et al.*, 2009b), a fluorescent dye, SYBR-Green, and an iCycler system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Rubber tree cDNA encoding actin was used as an internal control gene. PCR reactions were performed as follows: 5 min at 95°C for denaturation, 20 s at 95°C, 20 s at 58°C, 20 s at 72°C for amplification, and 10 min at 72°C for final extension. Relative PCR efficiencies were determined using dilution series of RT-PCR products as standards. All reactions were performed in triplicate. ΔCt was calculated from the formula $\Delta Ct = Ct_{(\text{treated sample})} - Ct_{(\text{control sample})}$. The normalized expression ratio (Qr) was calculated using the comparative Ct method, with the formula:

$Qr = E^{-\Delta\Delta Ct}$ (E= efficiency of the primers couple, $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{sucrose transporter}} - \Delta Ct_{\text{actin}}$)

This calculation method makes it possible to visualize the up- ($Qr>1$) and down-regulation ($Qr<1$) of genes. The efficiency of each primer couple was previously evaluated and found to

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

be comprised between 1.75 and 1.85. To compare the relative abundance of transcripts in different organs, the expression levels were calculated from the formula:

Expression = $E^{(Ct(actin)-Ct(sugar\ transporter))}$

All these calculation methods are reported in the Bio-Rad Real-Time PCR Application Guide.

Statistical processing

Since empirical errors on Q_r increased with Q_r data, consistent with the above exponential formulation, statistical procedures were performed on log-transformed data. Two samplings, each, consisting of two independent plants, were used to estimate an unbiased biological error (with 2 degrees of freedom), which was used to compute Student's *t* significance levels for mean comparisons. We only considered the results statistically different with $P<0.01$ (Student's t-Test) in our study for reasons of stringency.

Preparation of anti-HbSUT1B antibody

Anti-HbSUT1B antiserum was developed in rabbits (Proteogenix, Oberhausbergen, France) against a synthetic peptide (PDAPSAKTSRAVTAAFH) coupled to a carrier protein (KLH). Its sequence was derived from the specific C-terminal region of the HbSUT1B protein.

Isolation of the microsomal fraction, sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis and Western blot

Isolation of xylem microsomal fractions was performed according to Alves *et al.* (2001). Protein samples (30 mg) were subjected to sodium dodecyl sulphate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) according to Laemmli (1970). The gel system consisted of a 5% stacking gel and a 10% resolving gel. After gel electrophoresis, polypeptides were electroblotted onto a nitrocellulose membrane (Trans-Blot®, Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The transfer buffer contained 25 mM Tris, 193 mM glycin, 0.1% (w/v) SDS and 20% (v/v) methanol. The transfer was performed at a constant current of 400 mA for 2 h at room temperature. Tris-buffered saline (TBS) was used as the basic medium for immunoblotting. Tween 20 [0.1% (v/v)] and 10% (w/v) dry milk and were used to block nitrocellulose filters. Immunodetection was achieved with the HbSUT1B rabbit antiserum diluted 1/2000 as primary antibody, and antirabbit IgG (H + L) (P.A.R.I.S., Compiègne, France) as peroxydase-labelled secondary antibody, diluted 1/10000. The protein-antibody complex was detected with Western Lightning™ Plus-ECL (Perkin Elmer, Shelton, CT, USA).

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

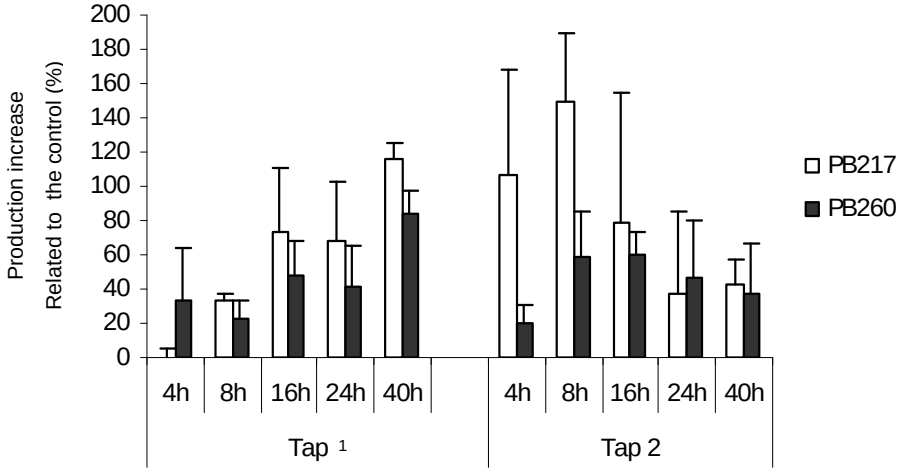


Figure 1 : Latex yield of exploited PB217 and PB260 trees after ethylene stimulation.

Batches of three homogenous mature trees, regularly tapped for two years but left to rest for three months, were treated with 5% ethylene 4 h, 8 h, 16 h, 24 h and 40 h before the first simultaneous tapping (Tap1). After three days without any treatment, a second tapping was performed on the same trees (Tap2). Latex production is expressed in percentage of increased production in relation to unstimulated tree production. The formula used was: Production increase (%) = [(Production of stimulated tree – Production of unstimulated tree)/Production of stimulated tree] x 100. Bars represent the biological standard deviation.

HbSUT1B immunolocalization in young stems

Young stem pieces from rejuvenated trees were fixed for 45 min at 4°C with 1.5% (v/v) formaldehyde and 0.5% (v/v) glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) containing 0.5% (v/v) dimethylsulfoxide. They were abundantly washed in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4, and then in PBS, pH 7.2 (containing 8 mM NaH2PO4, 1.5 mM KH2PO4, 140 mM NaCl and 2.7 mM KCl). Samples were cut into 15-mm sections with a microtome. Sections were rinsed in PBS, pH 7.2, and were placed for 15 min in PBS supplemented with 0.1% (v/v) Triton X-100, 0.2% (w/v) Glycin (pH 7.2). After these washings, non-specific sites were saturated for 45 min by normal goat serum in PBS, pH 7.2, 0.2% (v/v) Triton X-100, 0.2% (v/v) Tween, and 0.1% (w/v) bovine serum albumin (BSA), and incubated overnight with 1/2000 diluted antiserum against HbSUT1B. After washing in PBS, pH 7.2, and 0.1% (v/v) Triton X-100 (2 x 20 min) and then in TBS, pH 8.2, 0.2% (v/v) Triton X-100 (2 x 15 min), the sections were placed for 45 min in TBS, pH 8.2, 0.2% (v/v) Triton, 0.2% (v/v) Tween, 1% (w/v) BSA and 5% (v/v) normal goat serum. Sections were then incubated for 3 h with goat antirabbit antibody conjugated to alkaline phosphatase (Sigma, St Louis, MO, USA), diluted 1/40 in blocking solution. Tissue sections were washed with TBS and then incubated with chromogenic substrates, NBT and BCIP (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Color development was carried out at room temperature and was stopped by washing in H2O. Sections were then mounted onto microscopic slides, air-dried and covered with cover slips for microscopy analysis using Eukitt (Kindler GmbH & Co., Freiburg, Germany) as a mounting media.

Results

Latex Production

The data presented in Figure 1 indicate that ethylene application on the tapping cut provokes an increase in latex production in both PB217 and PB260 clones (Fig. 1). In PB217, this increase was significant as of 8 h after stimulation (35%) and reached a maximum 40 h after ethylene treatment for Tap1 (120% compared to the control). For Tap2, latex production increased as of 4 h and reached its maximum at 8 h (145%). It then gradually decreased until 40 h, at which time latex production remained relatively higher (40%) than in the control. In PB260, the stimulation of latex production took place earlier in Tap1, within the first 4 h, and reached its maximum at 40 h (80%) after ethylene treatment. For Tap2, latex production

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

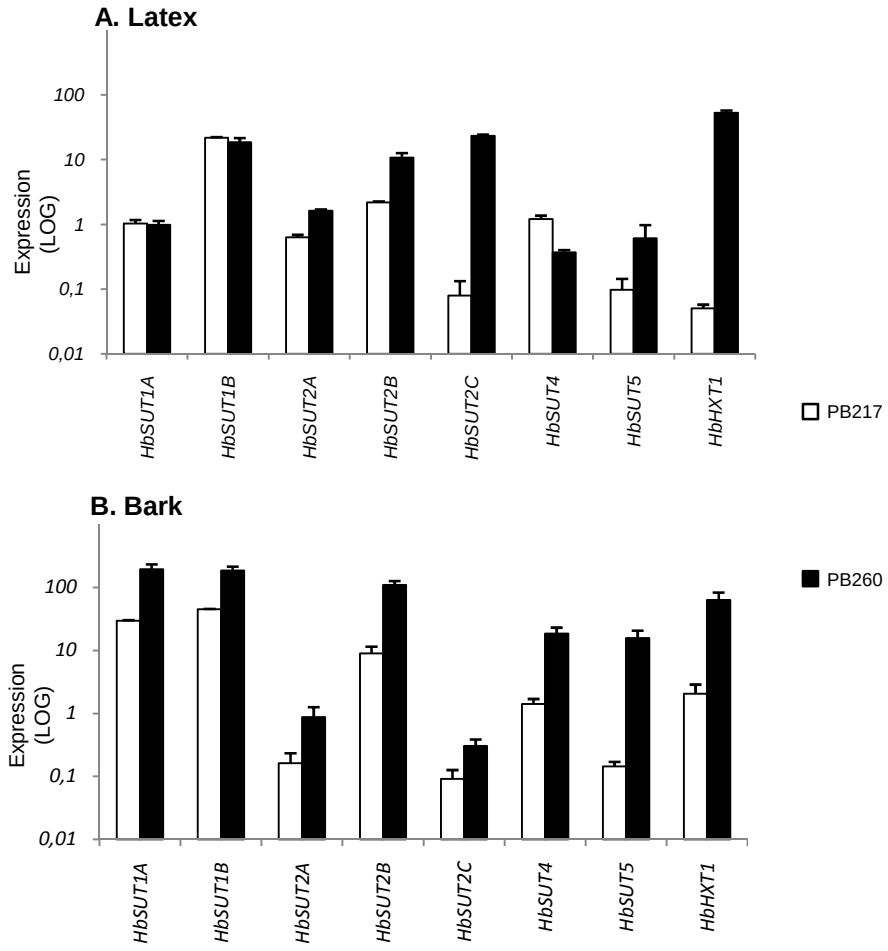


Figure 2 : Basal expression of HbSUTs and HbHXT1 in the latex and bark of exploited PB217 and PB260 trees.

Transcript levels of the seven isoforms of HbSUTs and of the isoform HbHXT1 were monitored in latex and bark tissues from PB217 and PB260 exploited trees (regularly tapped for two years but left to rest for three months). Latex (A) and bark (B) mRNA samples from mature exploited trees (PB217 and PB260, tapped for two years) were used for real-time RT-PCR. Qr was obtained using the E-ΔΔCt method with the unstimulated trees as references and with actin as the housekeeping gene. Bars represent the technical standard deviation. Results were statistically tested using the Student t-test, * indicates $P<0.05$ and ** $P<0.01$.

increased during the first 8 h (50%) and remained quite constant up to 40 h after treatment. At the end of the experiment (40 h), PB260 production was still 38% higher than in the control.

Basal expression of *HbSUTs* and *HbHXT1* in the latex of exploited trees of PB217 and PB260 clones

Specific oligonucleotides for each isoform of a putative sugar transporter, previously validated on unexploited trees samples (Dusotoit-Coucaud *et al.*, 2009b), were used for all real-time quantitative PCR analyses. First, the basal expression of the seven isoforms of sugar transporters cloned from *Hevea brasiliensis* was analyzed in the latex of both clones (Fig. 2A). For the PB217 clone, *HbSUT1B* is the highly expressed isoform in latex and was at least four times more abundant than all the other SUT isoforms. The isoforms of the SUT2 group (*HbSUT2A, HbSUT2B and HbSUT2C*), the SUT4 group (*HbSUT4* and *HbSUT5*) and the SUT1 group (*HbSUT1A*) were weakly expressed in PB217 latex. For the PB260 clone, *HbSUT1B* was once again the most highly expressed isoform in latex. It was about 10 times more expressed than the minor isoforms, *HbSUT1A*, *HbSUT2A*, *HbSUT4* and *HBSUT5*. Two other isoforms were also found to be highly expressed in PB260 latex: *HbSUT2B* and *HbSUT2C* (five and 12 times more expressed than the minor isoforms). As for PB217, the two isoforms of the SUT4 group were weakly expressed (Fig. 2A).
Concerning the hexose transporter *HbHXT1*, it was highly expressed in PB260 latex but not in PB217 latex (Fig. 2A).

Basal expression of *HbSUTs* and *HbHXT1* in bark tissues of exploited trees of PB217 and PB260 clones

HbSUTs presented similar expression patterns in both clones, but with very different rates (Fig. 2B). In the bark of PB217, three clusters of sucrose transporters could be identified on the basis of their basal expression level. *HbSUT1A*, *HbSUT1B* and *HbSUT2B* were the most highly expressed isoforms, with expression values of 30, 45 and 10, respectively, *HbSUT4* was moderately expressed, and *HbSUT2A*, *HbSUT2C* and *HbSUT5* were the most weakly expressed isoforms. These three clusters of sucrose transporters were also found in PB260 bark (Fig. 2B), with much higher expression values than in PB217. *HbSUT1A*, *HbSUT1B* and *HbSUT2B* were once again the most highly expressed isoforms, with expression values of 200, 180 and 110, respectively. *HbSUT4* and *HbSUT5* isoforms were moderately expressed

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

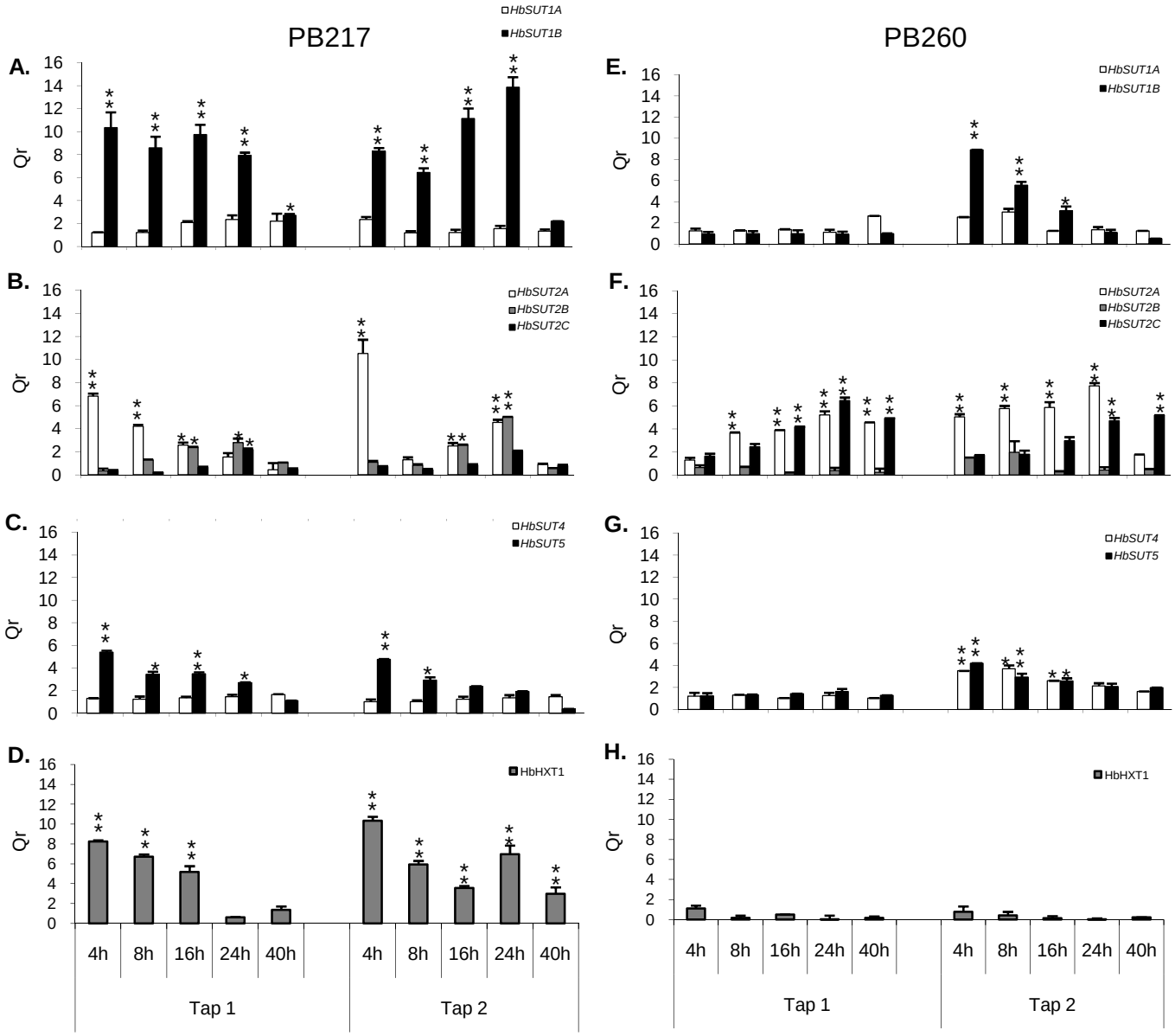


Figure 3 : Transcript accumulation of sugar transporters after ethylene stimulation in the latex of mature exploited PB217 and PB260 trees.

Transcript levels of sucrose transporters of the SUT1 group (A, E), SUT2 group (B, F), SUT4 group (C, G), and hexose transporters (D, H) were monitored after ethylene stimulation in the latex of exploited trees of both PB217 (A, B, C, D) and PB260 (E, F, G, H) clones. Samples were collected 4 h, 8 h, 16 h, 24 h and 40 h after the treatment (Tap1) and after three days of rest (Tap2). Latex mRNA samples from mature exploited trees were used for real-time RT-PCR. Qr was obtained using the E-ΔΔCt method with the unstimulated controls as references and with actin as the housekeeping gene. Bars represent the technical standard deviation. Results were statistically tested with the Student t-test, * indicates $P<0.05$ and ** $P<0.01$.

(about 15 times), and *HbSUT2A* and *HbSUT2C* were the most weakly expressed isoforms (Fig. 2B).

In comparison to PB217 bark, *HbHXT1* was very strongly expressed in the bark of PB260. Its expression value was 1.5 and 60 in PB217 and PB260, respectively (Fig. 2B).

Effect of ethylene treatment on the transcript levels of seven SUTs and one HXT isoform in the latex of PB217 and PB260 clones

Before analyzing the expression level of the various sugar transporters in the latex of ethylene-stimulated trees, we validated the ethylene treatment by verifying the ethylene-induced effect on *HbGS* gene expression (*Hevea brasiliensis* glutamine synthetase). *HbGS* expression has previously been shown to be ethylene-stimulated in latex (Pujade-Renaud *et al.*, 1994, 1997). The transcript level of this gene increased 16 h after treatment, reached a plateau (3-fold) until the end of Tap1. This expression gradually increased again during Tap2 until its expression value was eight times greater. This finding confirmed that bark treatment with ethylene was perceived at the molecular level in the latex of both PB217 and PB260 clones.

The data of Figs. 3A, B and C indicate that ethylene induced an up-regulation of three sugar transporter isoforms, *HbSUT1B, HbSUT2A* and *HbSUT5*, in the latex of PB217. *HbSUT1B* exhibited a very early (within the first 4 h) and significant induction over both Tap1 and Tap2 (Fig. 3A). However, the expression pattern of *HbSUT1B* differed between these two tappings. Its expression remained higher during the first 24 h (more than 8-fold) and dropped to 2.5-fold at the end of Tap1, before progressively increasing during Tap2. *HbSUT2A* and *HbSUT5* displayed the same expression pattern in response to ethylene (Figs. 3B and C) and for both tappings. On the whole, the *HbSUT2A* and *HbSUT5* transcript levels increased within the first 4 h of treatment (7- and 5-fold, respectively) but progressively decreased thereafter (Figs. 3B and C).

In the PB260 clone, the responses of latex sucrose transporters to ethylene were different from those of Pb217. In PB260, no ethylene induction of *HbSUT1B* was found in Tap1, and only an early and transient (from 4 h to 16 h) effect was observed in Tap2. *HbSUT2A* and *HbSUT2C* exhibited a slight and gradual ethylene induction during these two tappings. In Tap1, *HbSUT2A* and *HbSUT2C* presented a similar stimulation rate (from 3.5- to 5-fold), but exhibited a different stimulation rate during Tap2, during which the *HbSUT2A* level increased from 5- to 7-fold, while that of *HbSUT2C* increased only from 1.8- to 5-fold. Finally,

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

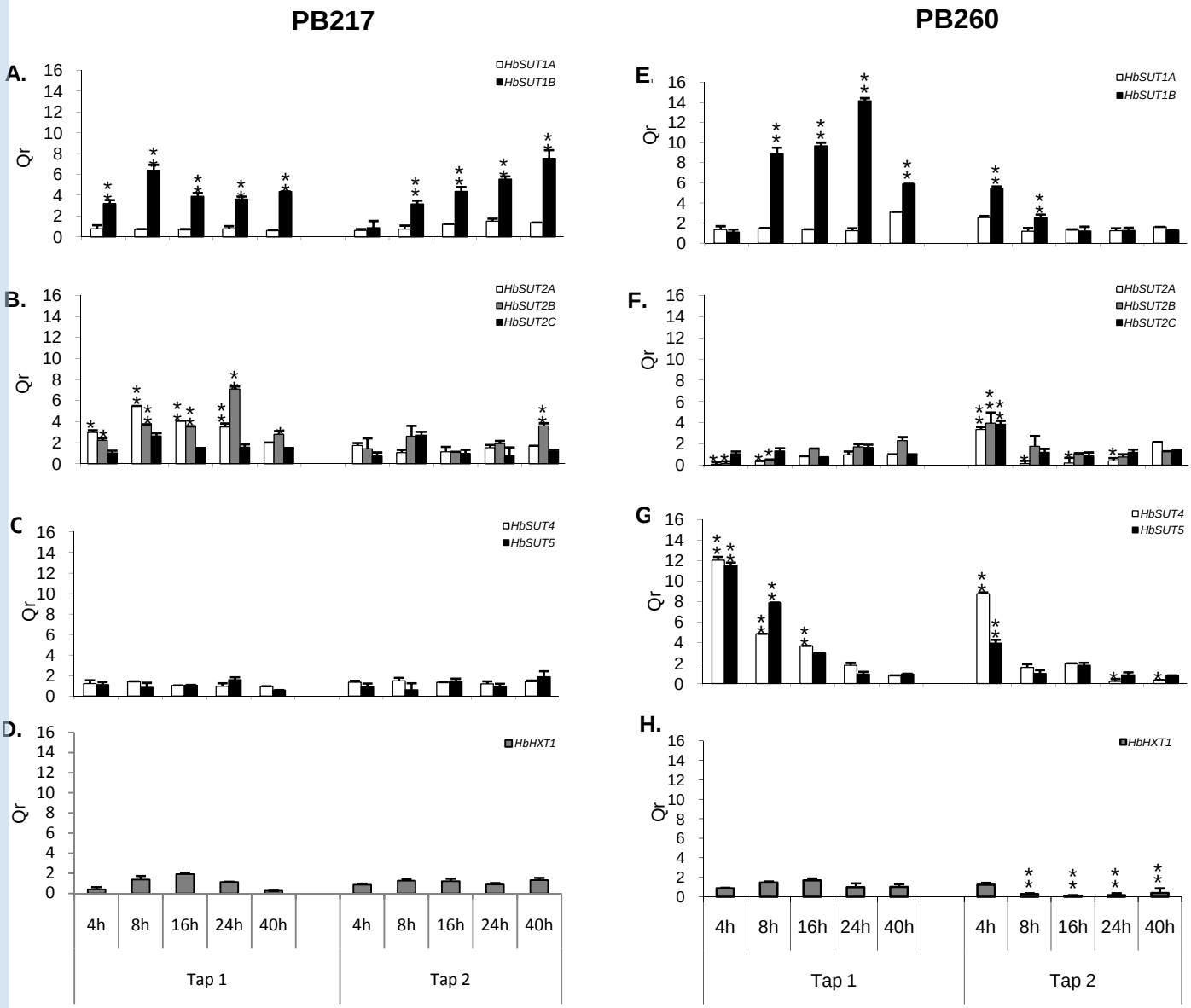


Figure 4 : Transcript accumulation of sugar transporters after ethylene stimulation in the bark of mature exploited PB217 and PB260 trees.

Transcript levels of sucrose transporters of the SUT1 group (A, E), SUT2 group (B, F), SUT4 group (C, G), and hexose transporters (D, H) were monitored after ethylene stimulation in the bark tissues of exploited trees of both PB217 (A, B, C, D) and PB260 (E, F, G, H) clones. Inner soft bark mRNA samples from mature exploited trees were used for real-time RT-PCR. Samples were collected 4 h, 8 h, 16 h, 24 h and 40 h after the treatment (Tap1) and after three days of rest (Tap2). Qr was obtained using the $E^{-\Delta\Delta Ct}$ method with the unstimulated controls as references and with actin as the housekeeping gene. Bars represent the technical standard deviation. Results were statistically tested with the Student t-test, * indicates $P<0.05$ and ** $P<0.01$.

HbSUT4 and *HbSUT5* were very slightly induced (Qr = 3.5) in the early second tapping (Fig. 3G).

With regards to *HbHXT1*, its ethylene-induced up-regulation was only observed in PB217 latex (Figs. 3D and H). For Tap1, its transcript level was early and strongly (8-fold) induced during the first 16 h and significantly decreased after 24 h of treatment (Fig. 3D). For Tap2, *HbHXT1* was induced during the first 4 h (12-fold) and progressively decreased to 3-fold at 40 h after treatment.

Effect of ethylene treatment on the transcript levels of seven SUTs and one HXT isoform in the bark of PB217 and PB260 clones

Bark is a heterogeneous tissue consisting of several independent and concentric layers of latex cells and other living cells such as phloem, cortical parenchyma cells and cambium. The latex cells represent around 5 to 10% of all living cells of the inner bark (d'Auzac *et al.*, 1989). Before checking whether ethylene treatment of the outer bark could regulate the expression level of sugar transporters in the inner bark, the ethylene-induced *HbAccO* (*Hevea brasiliensis* ACC Oxidase) expression was firstly verified in the two clones studied (Dr. H. Chrestin, personal communication). This data was considered as a molecular marker of inner soft bark response to ethylene treatment. Our data showed that the *HbAccO* level was ethylene-induced in both clones, supporting the molecular perception of the ethylene signal in the inner bark. Its expression pattern was similar in both clones. An up-regulation occurred after 8 h of treatment and remained stable throughout Tap1. For Tap2, it gradually decreased as of 8 h (data not shown).

In PB217 bark, the transcript levels of three SUT isoforms (*HbSUT1B, HbSUT2A* and *HbSUT2B)* appeared to be ethylene-regulated (Figs. 4A, B and C). The transcript level of *HbSUT1B* was ethylene up-regulated and showed a maximum accumulation (6-fold) at 8 h after treatment (Fig. 4A). During Tap2, the transcript level of *HbSUT1B* progressively increased to a maximum of 6-fold at 40 h. *HbSUT2A* and *HbSUT2B* exhibited a slight increase in their respective transcript levels in Tap1, with a maximum at 8 h for *HbSUT2A* (5-fold) and at 24 h for *HbSUT2B* (8-fold; Fig. 4B). The isoforms *HbSUT1A*, *HbSUT2C*, *HbSUT4* and *HbSUT5* did not display any response to ethylene treatment (Figs. 3A, B, C).

In PB260 bark, *HbSUT1B* also displayed an ethylene-up regulation. Its transcript level was strongly increased after 8 h of treatment in the Tap1, reached a maximum of 14 fold at 24 h of treatment, and then progressively decreased from 40 h until the end of Tap2 (Fig. 4E). The

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

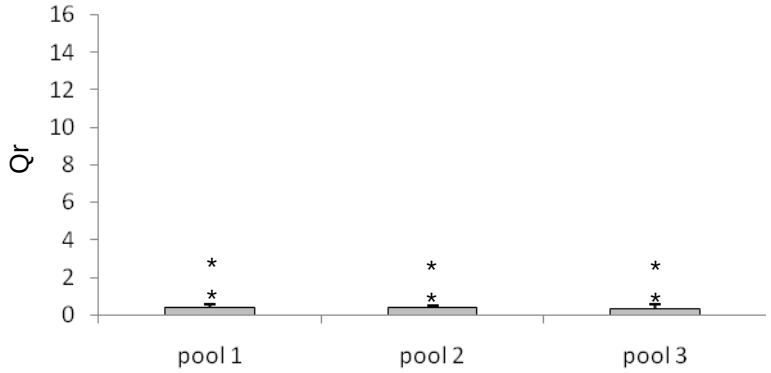


Figure 5 : Transcript accumulation of HbSUT1B in the latex of necrosed PB217 trees

Transcript levels of HbSUT1B were monitored in the latex of three batches of three necrosed PB217 trees. Latex mRNA samples from completely dry necrosed trees were analyzed by real-time RT-PCR. Qr was obtained using the E-ΔΔCt method with healthy trees as references and with actin as the housekeeping gene. Bars represent the technical standard deviation. Results were statistically tested with the Student t-test, * indicates $P<0.05$ and ** $P<0.01$.

transcript level of *HbSUT4* and *HbSUT5* were also ethylene up-regulated in both tappings. They were up-regulated during the first 4 h of the treatment and then decreased thereafter until the end of the ethylene treatment (Fig. 4G).

Concerning *HbHXT1*, its transcript level did not exhibit any significant ethylene response in bark tissues of either PB217 or PB260 (Figs. 4D and H).

HbSUT1B expression in the latex of trees affected by necrosis (TPN)

In order to strengthen the hypothesis of the eventual involvement of *HbSUT1B* in latex production, its expression was analyzed in the latex of TPN-affected PB217 trees. TPN (Trunk Phloem Necrosis) is a multifactorial disease, which induces "dryness panel" syndrome, leading to a decrease or a complete halt in latex production. The transcript level of *HbSUT1B* was monitored in the latex of three independent batches of partially dry trees. A very strong reduction of *HbSUT1B* transcript level was found in the latex of these dry trees, in comparison to that of the control (healthy tree, Fig. 5)

Impact of exploitation on SUT transcript accumulation in the PB217 clone

Tapping represents a serious abiotic stress for exploited trees. It consists of deeply wounding the outer and inner barks, and induces latex cells to completely regenerate their cytoplasm after latex expulsion. It has been demonstrated that plants are able to adapt to stressful environments by inducing substantial molecular changes and gene expression rearrangements (Arteca and Arteca, 1999; Zarka *et al.*, 2003). In this context, to check whether the repeated tappings affect the transcript level of sugar transporters, the same ethylene treatment kinetics were carried out on virgin trees (at the opening) and on those exploited for two years. This comparison was only made on *HbSUT1B* and *HbHXT1*, which were found to be highly ethylene up-regulated in exploited PB217 trees.

Interestingly, both of the isoforms tested were ethylene-regulated and their response was dependent on the exploitation status of the trees. The transcript level of *HbSUT1B* was strongly increased by ethylene in the latex of exploited trees but was hardly affected by ethylene in that of virgin trees (Fig. 6A). Similarly, the *HbHXT1* transcript level was ethylene up-regulated only in the latex of exploited trees but not in virgin trees (Fig. 6C).

With regard to bark (Figs. 6B and D), a similar pattern was globally observed, especially for *HbSUT1*. The *HbSUT1B* level was significantly ethylene up-regulated in exploited trees,

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

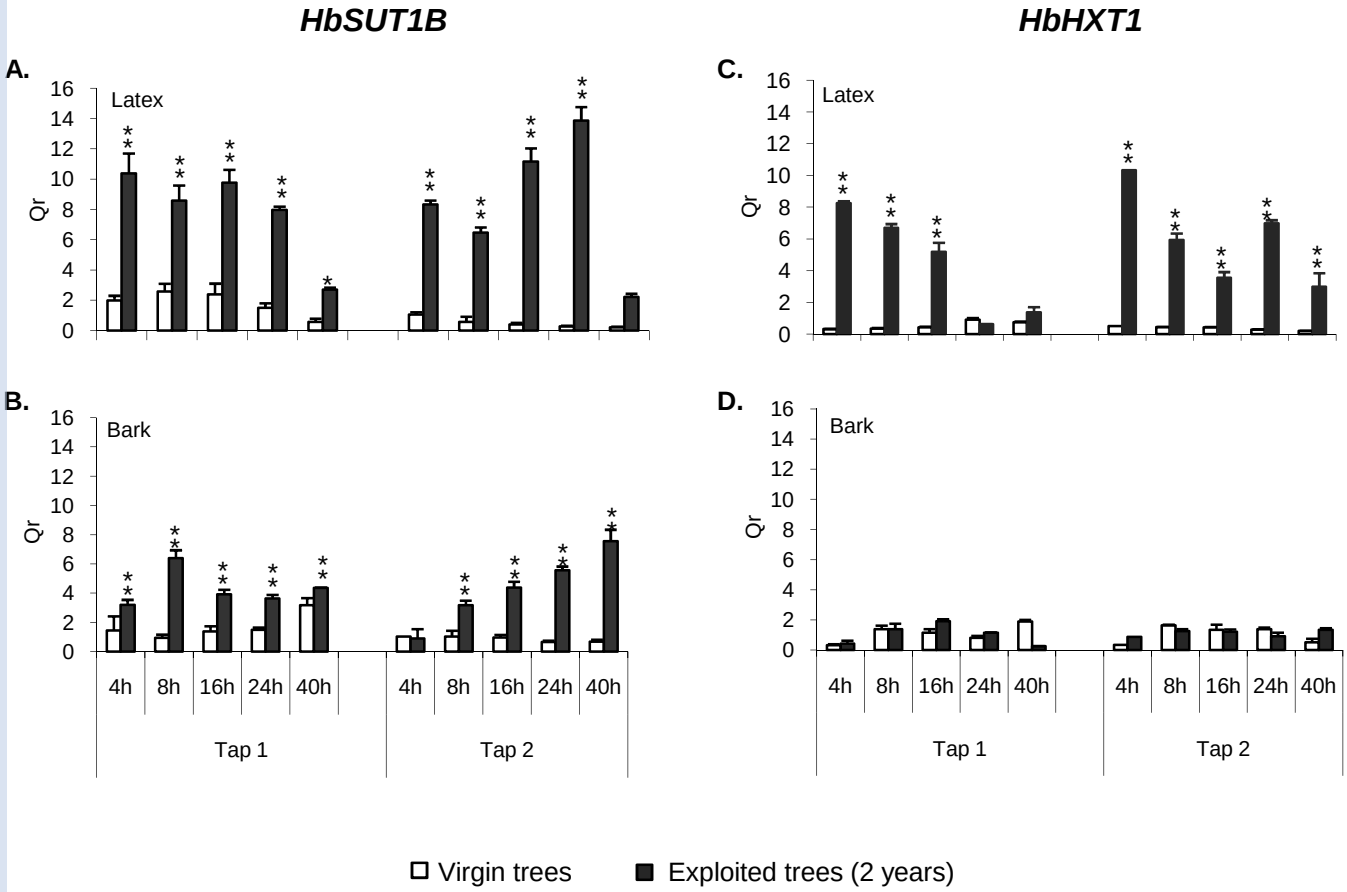


Figure 6 : Transcript accumulation of *HbSUT1B* and *HbHXT1* in the latex and bark of virgin and exploited trees.

Transcript levels of sucrose transporters HbSUT1B (A, B) and hexose transporter HbHXT1 (C, D) were monitored after ethylene stimulation in latex (A, C) and bark tissues (B, D) of PB217 trees, either virgin or under regular exploitation for two years. Latex and inner soft bark mRNA samples from virgin and exploited mature trees were analyzed by real-time RT-PCR. Qr was obtained using the E-ΔΔCt method with the unstimulated controls as references and with actin as the housekeeping gene. Bars represent the technical standard deviation. Results were statistically tested with the Student t-test, * indicates $P<0.05$ and ** $P<0.01$.

whereas it was barely modulated in virgin trees (Fig. 6B). *HbHXT1* did not appear to be ethylene-regulated in the bark of either virgin or exploited trees (Fig. 6D).

Immunolocalization of HbSUT1B in young hevea stems

In this study, *HbSUT1B* appears as potentially important for latex production and clonal differentiation, according to studies at the molecular level (mRNA). Additional data on the corresponding putative protein would permit to understand more clearly the role of *HbSUT1B* in exploited trees. In this context, an anti-*HbSUT1B* serum was synthesized. First it was tested in western-blot analysis with bark microsomal proteins, to check its specificity (figure 7A). and immunolocalisation experiments were conducted on young hevea stem cut. Pre-immune serum (PS) was used as a negative control, and no hybridization was revealed (figure 7A). With the anti-serum (AS), a specific band was observed with an apparent molecular weight approximately equivalent to those for *HbSUT1B* (56 kDa).

Immunolocalization experiments were then carried out on young hevea stem cuts. With the PS, an aspecific coloration was observed in xylem (figure 7B), consequently the same coloration with anti-serum was not considered as a real hybridization signal (figure 7C). With the AS, a specific coloration was detected, confirming the presence of the HbSUT1B protein. The signal was found in the schlerenchyma cells and especially in latex cells (figure 7D and E). Indeed these cells showed irregular shapes, a dense granular cytosol, and anastomoses were also observed between these cells (arrows, in figure 7E).

Discussion

Both monosaccharide and disaccharide transporters have now been characterized in many plants. Some of these transporters have been found in most of the sink organs, including roots, floral organs, fruits, and developing and germinating seeds, where they play different roles (Lemoine, 2000; Williams *et al.*, 2000; Sauer, 2007). In hevea trees, sugar flux into latex cells has long been considered as a critical parameter for latex production yield (Lacrotte, 1991; Gohet, 1996). However, the exact role of sugar co-transporters in this process has received little attention so far. As a first step towards increasing out knowledge about this, eight putative sugar transporters were recently isolated from a latex-cDNA library and their respective expression pattern was described in relation to latex stimulation by ethylene application in virgin trees (Dusotoit-Coucaud *et al.*, 2009b). Our first data showed that the expression of *HbSUT2A* and, to a lesser extent, *HbSUT1A*, is correlated with ethylene-

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

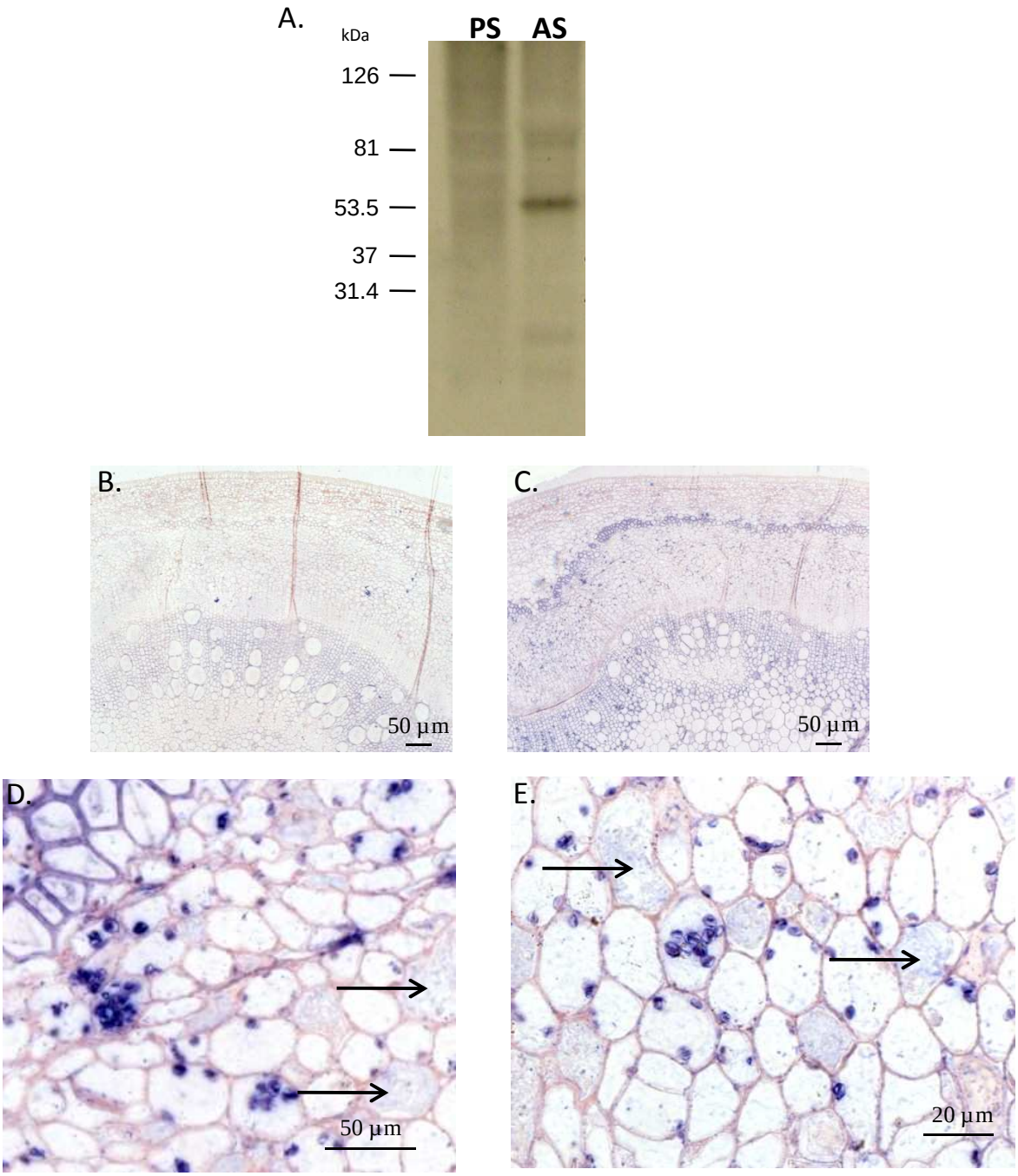


Figure 7: Western blot on bark microsomal proteins and immunolocalization of HbSUT1B

Anti-HbSUT1B antiserum was produced in rabbits (Proteogenix, Oberhausbergen, France) against a synthetic peptide (PDAPSAKTSRAVTAAFH) coupled to a carrier protein (KLH). Its sequence was derived from the specific C-terminal region of the HbSUT1B protein. (A) Western blot with the antiserum (AS) was carried out on 30 µg of proteins from bark microsomal fractions (extraction according to Alves et al., 2001) as described in Decourteix et al. (2006). Pre-immune serum (PS) was used as a control. (B and C) Immunolocalization experiments were conducted on young stem sections from rejuvenated PB217 trees (Brunel et al., 2003). Pre-immune serum (B) and anti-HbSUT1B serum (C) were used as negative and positive controls, respectively. Arrows indicate latex cells.

stimulated latex production in virgin PB217 trees. To increase our understanding of the involvement of these sugar transporters in this process, we analyzed their expression patterns in exploited trees and in two hevea clones (PB217 and PB260) that differ by their metabolic activity and the response of their latex production to ethylene application.

Basal level of sugar transporter transcripts is clonal dependant

Latex diagnostic data initially showed a clonal variability in terms of latex sucrose concentration between PB217 and PB260, revealing that sucrose concentration is much higher in PB217 latex than in PB260 latex (Jacob *et al.*, 1995; Gohet *et al.*, 2003). This difference may reflect the combined activity of latex cells to download and to incorporate sucrose in their metabolic network. A higher metabolic activity in PB260 latex cells was proposed on the basis of the Pi concentration, which usually serves as a marker of cellular metabolism intensity (Gohet *et al*., 2003). In terms of sugar transporters, these two hevea clones also differ by their basal level of sugar transporters in latex cells and inner bark cells (Fig. 2). Generally, PB260 exhibits a larger basal amount of sugar transporter transcript than PB217, which corresponds well to its high metabolic activity. The greatest difference was found in latex cells for *HbSUT2C* and *HbHXT1* (Fig. 2A) and in inner bark cells for *HbSUT5* (Fig. 2B). The relative transcript amount of *HbSUT1A* and *HbSUT1B* was equal in latex cells of these clones (Fig. 2A). Many studies have reported a close correlation between the accumulation of sugar transporter transcripts and the capacity of cells to import sugar (Rosche *et al.*, 2002; Hayes *et al.*, 2007; Decourteix *et al*., 2006, 2008). For example, the accumulation of *JrSUT1* (*Juglans regia* sucrose transporter 1) transcripts in xylem parenchyma cells during the winter period is accompanied by an increase in the active sucrose uptake by the same cells (Decourteix *et al.*, 2006). It is more likely that the elevated basal latex production (without ethylene application) of PB260 may be related not only to a stronger metabolic activity (Gohet *et al*., 2003) but also to the high abundance of sugar transporters in its latex cells (Fig. 2B). This is in agreement with the low basal latex production of PB217, for which a relatively low abundance of sugar transporters (Fig. 2A) and a weak metabolic activity (Gohet *et al*., 2003) were described.

Recent transcriptomic studies revealed that ethylene regulates the expression of genes involved in metabolism (Alonso *et al.*, 2003; de Paepe *et al.*, 2004). Moreover, the expression of sugar transporters is known to be modulated by many exogenous (light, pathogens, wounding) and endogenous stimuli (hormones, sugar concentration), including ethylene

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

(Chincinska *et al.*, 2008). The expression of a *Solanum tuberosum* Sucrose Transporter 4 (*StSUT4*) was enhanced by ethylene in potato leaves (Chincinska *et al*., 2008). In this context, our hypothesis is that the ethylene-stimulated latex production in PB217 may be due, at least in part, to an increase of sugar flux into latex cells through an up-regulation of sugar transporters, and that this ethylene effect would be clonal-dependent. A clonal transcript regulation of genes has already been reported for three hevea tree clones (GT1, PB217, RRIM600), for which relative amounts of *HbGS* (*Hevea brasiliensis* Glutamine synthetase) were more highly induced by ethylene in the latex of RRIM600 and PB217 clones than in GT1 (Pujade-Renaud *et al.*, 1994).

HbSUT1B **and, to a lesser extent,** ***HbHXT1,*** **may account for the ethylene stimulation of latex production in PB217**

PB217 is characterized as a low rubber producer but highly responsive to ethylene stimulation, while PB260 is considered to be a high rubber producer but less responsive to ethylene treatment (Gohet *et al.*, 2003). These features are in agreement with the data of Fig. 1, clearly showing that ethylene application stimulates latex production much more in PB217 than in PB260 (increase of 140% and 70% for PB217 and PB260, respectively). To evaluate the importance of sugar transporters in this process, their transcript level was compared in both of these hevea clones. In contrast to PB260, transcript accumulation of sugar transporters in latex cells of PB217 increased after ethylene treatment (Fig. 3A). This ethylene effect could not be extended to all sugar transporter isoforms, but was rather limited to one putative sucrose transporter (*HbSUT1B)* and one putative hexose transporter (*HbHXT1*). *HbSUT1B* is by far the most abundant sucrose transporter isoform in latex cells of virgin (Dusotoit-Coucaud *et al.*, 2009b) and exploited trees (Fig. 2A) of PB217. Its relative transcript amount was very highly stimulated (up to 10-fold) and early (as of 4 h) as a result of ethylene treatment during Tap1, and from 4 h to 24 h (with a maximum 14-fold) during Tap2 (Fig. 3A). The relative amount of *HbHXT1* was early (as of 4 h) and transiently up-regulated (with a maximum of 8-fold) by ethylene during Tap1, and as of 4 h (10-fold) after treatment during Tap2 (Fig. 3D). In PB260 latex cells, no increase of the relative amount of *HbSUT1B*, which is one of the most abundant sucrose transporter isoforms (Fig. 2A), was found during Tap1, and the only increase occurred during the first 8 h of Tap2, before a progressive decrease (Fig. 3E). Likewise, no ethylene stimulation was observed for *HbXT1* (Fig. 3H), which is one of the most highly expressed sugar transporter isoforms in PB260 latex cells (Fig. 2A). Besides

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

HbSUT1B and *HbHXT1*, transcript levels of other sucrose transporters were up-regulated in PB217 (*HbSUT2A* and *HbSUT5*) and PB260 (*HbSUT2A* and *HbSUT2C)* latex, but with low rates (Fig. 3). All these data support the hypothesis that ethylene application leads to higher accumulation of sugar transporter transcripts in latex cells of PB217 than those of PB260.

***HbSUT1B* and *HbHXT1* may account for the differential effect of ethylene on latex production in PB217 and PB260**

It is well known that ethylene application raises the sink strength of latex cells in rubber trees by increasing glycolysis activity (Tupy and Primot, 1982), sucrose concentration in latex (Tupy and Primot, 1976; Low and Gomez, 1982) and both sucrose influx and H^+/ATPase activity (d'Auzac *et al*., 1982 Tupy, 1984, Lacrotte, 1985; Lacrotte, 1991). The specific transcript accumulation of *HbSUT1B* and *HbHXT1* in PB217 latex cells can promote higher carbohydrate influx into these cells, required for ethylene-stimulated latex production. This is in perfect accordance with the fact that only a weak ethylene up-regulation of sugar transporters was found in PB260 (Fig. 3), for which latex production is less stimulated by ethylene, in comparison to PB217 (Fig. 1; Gohet *et al*., 2003). This relationship between the relative transcript amount of sugar transporters and the stimulation of latex production by ethylene is also supported by the *HbSUT1B* expression pattern in the inner bark of PB260, when compared to PB217 (Fig. 4). The relative transcript amount of *HbSUT1B*, which is one of the most highly expressed sucrose transporter isoforms in bark (Fig. 2B), was increased from 8 h to 24 h in Tap1 (with a maximum of 14-fold), and as of 4 h after ethylene treatment in Tap2 (4-fold, Fig. 4E) in the PB260 clone. To a lesser extent, *HbSUT4* and *HbSUT5* were also increased by ethylene treatment during the first 8 h of Tap1 and the first 4 h of Tap2. Interestingly, these two sucrose transporter isoforms are preferentially expressed in the inner bark of PB260 (Fig. 2B). Concerning PB217, it is worth noting that the relative transcript amount of *HbSUT1B* was globally weaker in the inner bark than in latex cells (Figs. 3A and 4A), while the contrary is true for PB260 (Figs. 3E and 4E). Such specific ethylene-induced accumulation of *HbSUT1B* in the bark of PB260 can make it a much more attractive sink than latex and thereby divert a part of soluble sugar to the detriment of latex cells. This scenario cannot be applied to PB217, known as a low rubber producer but highly responsive to ethylene stimulation. For this clone, ethylene application leads mainly to an increase in *HbSUT1B* and *HbHXT1* transcripts in latex cells and can therefore enable them to enhance their sugar influx required for ethylene-stimulated latex production. All these data thus

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

support the idea that *HbSUT1B* and *HbHXT1* could account, at least in part, for the differential effect of ethylene on latex production in PB217 and PB260.

HbSUT1B and *HbHXT1* transcript accumulation in latex cells may be regulated by the carbon demand

Expression patterns of *HbSUTs* and *HbHXT1* are different in virgin (untapped trees, Dusotoit-Coucaud *et al.*, 2009b) and in exploited trees (Fig. 3). We previously showed that the relative transcript amount of *HbSUT2A* and, to a lesser extent, *HbSUT1A*, in virgin PB217 trees was correlated with ethylene-stimulated latex production, whereas *HbSUT1B* and *HbHXT1* did not exhibit any potential involvement in this process (Dusotoit-Coucaud *et al.*, 2009b). In contrast, *HbSUT1B* and *HbHXT1* may be involved in the stimulation of latex production by ethylene in exploited trees (Figs. 3 and 4). This shift in sugar transporter regulation may reflect the ability of latex cells to adjust their transport capacity to different modifications imposed by the exploitation process. The exploitation process is a repeated and complex stress, consisting of severe wounding, sometimes combined with artificial metabolism stimulation by ethylene, and implies a constitutive high metabolic activity due to the latex regeneration between every two consecutive tappings (from three to six days, depending on the plantation). These physiological conditions imply a higher carbon demand for latex cells of exploited trees than for virgin trees. This is in accordance with our data showing a differential effect of ethylene application on *HbSUTB1*, which is the most abundant sucrose transport isoform in both latex of virgin (Dusotoit-Coucaud *et al.*, 2009b) and exploited trees of PB217 (Fig. 2A). This ethylene application strongly increased the relative amount of *HbSUT1B* in the latex cells of exploited trees while it significantly reduced it in virgin trees. In the latter, ethylene application gives rise to an accumulation of *HbSUT2A*, which is very weakly expressed in latex cells. From a functional point of view, these dynamics of sugar transporter regulation support our hypothesis in that *HbSUT1B* and *HbSUT2A* belong to two SUT groups that differ by their affinity for sucrose (Sauer *et al.*, 2007). *HbSUT1B*, which is the most abundant isoform in exploited trees, belongs to group II whose isoforms are characterized by their higher affinity (Km ≤ 3 mM; Sivitz *et al.*, 2007) than those of group III (HbSUT2A), for which medium affinity was measured (Km ± 5mM; Weise *et al.*, 2000). All these findings support the idea that latex cells adjust finely and adequately to their sugar transport equipment in relation to their carbon demand. A similar scenario was reported for active sink organs such as grape berry (Hayes *et al.*, 2007) and pollen (Trüernit *et al.*, 1999;

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

Scholz-Starke *et al.*, 2003; Schneidereit *et al.*, 2003; Schneidereit *et al.*, 2005). In the latter case, *AtSTP2* is expressed only during the early stages and *AtSTP4* only in the plasma membrane of pollen tubes, whereas it is absent before germination (Trüernit *et al.*, 1999). The expression of *AtSTP6* begins in pollen grains (Scholz-Starke *et al*., 2003), *AtSTP9* is expressed from stage 10 of the flower until pollen germination (Schneidereit *et al*., 2003) and, finally, ATSTP11 is expressed during germination, and only in the pollen tube (Schneidereit *et al*., 2005). It appears that five of the 14 hexose transporters are expressed at very specific stages of pollen development, depending on the carbon demand.

We hypothesize that in rubber trees, latex cells might be able to adapt their sugar transporter equipment, at least in part, in terms of transcript, to the exploitation process.

In conclusion, we provide here the first data about the molecular characterization of eight putative sugar transporters in two hevea tree clones, which differ by their metabolic activity and by the ethylene effect on their latex production. Our data underlines a possible role of *HbSUT1B* and, to a lesser extent, *HbXHT1*, in the sucrose supply of latex cells, necessary for the ethylene stimulation of latex production in PB217. Moreover, ethylene-mediated *HbSUT1B* regulation is clonal-dependent and may account, at least in part, for the differential response of latex production to ethylene application. These data provide the first foundation for the role of sucrose transporters in latex production and should be extended to other hevea trees clones. A co-localization of production QTLs and *HbSUT1B* genes would enable us to validate the function of this isoform in the near future.

Funding

We are grateful to Michelin group which supported this work.

Acknowledgements

We are grateful to the staff of the SIPH Headquarters and of the Bongo Rubber Plantation in Côte d'Ivoire (West Africa) for their logistical and technical help in field experiments, as well as for allowing access to all their plant materials and laboratory facilities.

Literature Cited

Dans un souci d'allègement la liste bibliographique est intégrée à la Bibliographie finale du manuscrit de thèse (p128).

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

J. Rubb. Res., **12(3)**, 125–139

Molecular Characterisation of the Sucrose Transporter HbSUT1B *in Relation to Rubber Production in Latex Cells*

A. DUSOTOIT-COUCAUD*, N. BRUNEL*, J. FRANCHEL*,
F. GRANET**, H. CHRESTIN*** AND S. SAKR****#

The rubber synthesis in latex cells requires sucrose. These particular cells are heterotrophic ones and are apoplastically connected to other tissues. Such features imply that the rubber yield may depend on the latex cell efficiency to absorb and to use the imported sucrose. This study investigates the sucrose transporters as key genes for rubber biosynthesis involved in the ethylene-stimulated rubber yield. Seven putative sucrose transporters had been isolated from a latex-derived cDNA library of PB 217. Expression profiling of these sucrose transporters under ethylene stimulation in PB 217 underlined the role of one sucrose transporter: HbSUT1B (*Hevea brasiliensis* Sucrose Transporter 6) *(Dusotoit-Coucaud* et al., *2007). This paper reports the next stage in* HbSUT1B, *molecular characterisation. Its expression in different parts of the rubber tree was studied. It was preferentially expressed in leaves and bark. This result was completed by* in-situ *hybridisation experiments. In addition, promoter cloning and analysis revealed some clues for the wounding regulation of* HbSUT1B. *The* HbSUT1B *expression was analysed in response to different treatments in latex or bark tissues.* HbSUT1B *was considerably up-regulated by hormones and wounding in bark but not in latex. This regulation appeared to be tissue-specific.*

Keywords: sucrose transporters; *HbSUT1B*; rubber production; latex cells; molecular regulation

Laticifers are highly specialised cells from the bark of *Hevea brasiliensis*. Their cytoplasm is called latex and contains rubber particles[1,2]. After tapping (to collect rubber), the latex flows out of the laticifers under pressure. Laticifers have to completely regenerate their cytoplasm (except nuclei and mitochondria) to synthesise rubber particles. Latex cells consist of a heterotrophic sink, they have to import sucrose to meet their high carbon and energy demand[3–6]. Ultrastructural studies have shown that laticifers organised in an isolated network, do not have plasmodesmata[7,8]. Electrophysiological studies have indicated

* UMR 547 PIAF, INRA, Université Blaise Pascal, 24 avenue des Landais, 63177 Aubière Cedex, France.
** UR 060, Institut de Recherche pour le Développement (IRD), Montpellier, France.
*** Composants Naturels, MFP Michelin, Clermont-Ferrand, France.
**** Agrocampus-ouest, Centre d'Angers, UMR SAGAH, IFR QUASAV 149, 2 rue le Nôtre, 49045 Angers Cedex, France
# Corresponding author (e-mail: soulaiman.sakr@agrocampus-ouest.fr)

Thèse Anaïs Dusotoit-Coucaud, 2009

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

that sucrose influx into the latex protoplasts leads to a plasma membrane depolarisation[9]. Based on these observations, it has been postulated that sucrose uptake may be mediated by plasma membrane sucrose transporters.

In herbaceous species, many sucrose transporters have been isolated and well-characterised over the last decade[10]. In woody species, however, few sucrose transporters have been cloned to date. These share significant homology with those previously isolated from herbaceous species. In general, the sucrose transporters, belonging to the MFS family (Major Facilitative Superfamily), are encoded by a multigenic family and exhibit 12 transmembrane helices. According to their specificity and loading capacity in heterologous systems, sucrose transporters are divided into three distinct groups. The SUT1 group is characterised by a low capacity and high affinity (Km < 3mM). The SUT4 group has a relatively low affinity (5mM < Km < 11.6mM) but a high capacity and the SUT2 group includes putative sucrose sensors (*AtSUT2*, *Arabidopsis thaliana* Sucrose Transporter 2, *LeSUT2*, *Lycopersicon esculentum* Sucrose Transporter 2[11]) and functional sucrose transporters (*PmSUC3*, *Plantago major* Sucrose Carrier 3[12]).

Sucrose transporters are known to be controlled at the transcriptional[13], post-transcriptional[14] and post-translational[15] levels. They are regulated by several exogenous and endogenous factors like hormones[16,17]. Sucrose transporters are expressed in source and sink organs (*Arabidospis thaliana* Sucrose Carrier 5[18], *Juglans regia* Sucrose Transporter 1[19]). For example, *AtSUC1* and *AtSUC2* are expressed in young and mature leaves in *Arabidopsis thaliana* but only *AtSUC1* is expressed in the roots[20]. In addition, *AtSUC2* transcripts are detected in the phloem, specifically in the companion cells, whereas *AtSUC1* is mainly expressed in non-phloem leaf cells[21].

Sucrose transporters are implicated in numerous different physiological processes. For example, *AtSUC5* is specifically expressed in the endosperm and is involved in the filial tissue nutrition during early seed development in *Arabidopsis*[18]. Several sucrose transporters are known to be involved in phloem loading: *LeSUT1* (*Lycopersicon esculentum* Sucrose Transporter 1[22]); *DcSUT1* (*Daucus carota* Sucrose Transporter 1[23]) and *OsSUT1* (*Oryza sativa* Sucrose Transporter 1[24]).

Although sucrose acts as a precursor in rubber synthesis in laticifers, the role of its corresponding transporter in the latex yield has only been investigated very recently. In fact, seven isoforms of sucrose transporters have been cloned by screening a latex cDNA library from PB 217 trees by Dusotoit-Coucaud *et al.*[25] and direct submission by Yang *et al*[38]. These genes have been found to be homologous to the sucrose transporters previously cloned in herbaceous and woody species. Two isoforms have been identified as belonging to SUT1 group (*HbSUT1, HbSUT1B*); two others to SUT4 group (*HbSUT4, HbSUT5*) and three to SUT2 group (*HbSUT2A, HbSUT2B, HbSUT2C*). This work also indicated that the major sucrose transporter in the laticifers, *HbSUT1B*, may be involved in latex production. *HbSUT1B* is the most highly expressed isoform in the latex of mature unstimulated trees and show very high and prolonged upregulation upon ethylene treatment.

The present work completes our first study on latex sucrose transporters and their expected implication in the latex yield. Our attention focuses here on the regulation of *HbSUT1B*, which has already been reported as playing a potential role in latex production. This study was monitored with young or mature virgin trees of PB 217 and PB 260. A series of experiments were carried out to bring into light elements in *HbSUT1B* expression pattern in leaves, stem and bark.

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

EXPERIMENTAL

Material

Plant Material. The trees used for RNA extraction, *in situ* hybridisation and promoter cloning came from a controlled environment room (Michelin, Ladoux, France). The trees were cut back six months earlier. Trees of PB 217 were used for the expression analysis in different cells and for *in situ* hybridisation. For the promoter cloning, trees of PB 217 and PB 260 were used.

The latex and bark samples for RNA extraction were collected after hormonal treatments from rubber trees of PB 217 which had been ½ spiral-tapped for two years and selected for their medium, homogenous growth and yield from the Bongo/SAPH plantation (Ivory Coast).

Controlled environment chamber at Composants Naturels (CPN) Ladoux, France. The culture conditions of young trees were determined as follows: 12h daylight, at 27–30°C, with 70 ± 10% relative humidity, light at 40 µE m^{-2} s^{-1} (day) and at 25°C, with 90% relative humidity (night). Each pot was connected to the watering system and sprayed twice a day for 3 mins. 15 gL^{-1} fertilizer was added to the water.

Field experiments (Bongo/SAPH). Five batches of three virgin mature trees were set-up. One batch as a control (untreated) and four others were treated on a 1 cm wide slightly scraped bark band, just beneath S/2 tapping cut: 2.5% jasmonic acid (JA), 625 µM salicylic acid (SA), 1% 4-chlorophenoxyacetic acid (CPA, auxin analog), 2.5% abscissic acid (ABA) (1.5 mL in ethanol 0.25% final, 0.05% Tween 20 in water) or nails (N) for 4, 8 and 16 hours, respectively, before the first tapping and in accordance with Kongsawadworakul *et al.*[26]. The latex and total inner soft bark samples were collected on the same day and analysed as the 1st tapping (R1). After 3 days without treatment, samples from these same trees were collected again and analysed as the second tapping (R2).

Methods

Latex collection and RNA extraction. Latex and bark collection and total RNA extraction were performed according to the method adapted from Pujade-Renaud *et al.*[27] and developed by Kongsawadworakul *et al.*[26].

Real time PCR. The real time PCR technique was used to study the transcript accumulation of *HbSUT1B*, using specific primer couples designed in the 3'-untranslated region[25]. After RNA samples were treated with DNase I, 2 µg total RNA were used as templates in the first strand cDNA synthesis reaction (SuperScript-III, Invitrogen). Real time PCR was carried out using the generated cDNA as template, a fluorescent SYBR-Green dye and an iCycler system (Bio-Rad). Rubber tree cDNA encoding actin RNA was used as internal control gene. The real time PCR were run at least as four individual experiments (two experiments on two different Reverse Transcription) and performed in triplicates. The raw results were given by the real time PCR machine as Ct value (threshold cycle) corresponding to the cycle number at which the amplified product accumulates to yield a detectable fluorescent signal at the beginning of the exponential stage of PCR amplification. ΔCt was calculated from the formula $\Delta Ct = Ct_{(\text{treated sample})} - Ct_{(\text{control sample})}$. The normalised expression ratio (Qr) could be calculated using the comparative Ct method, with the formula: $Qr = E^{-\Delta\Delta Ct}$ (E= efficiency of the primer couple, ΔΔCt = Sucrose transporter-Actin). The efficiency of the primer couple had been previously evaluated. To compare the abundance of *HbSUT1B* transcripts in different organs, the expression levels were

Journal of Rubber Research, Volume 12(3), 2009

calculated from the formula:
Expression = $E^{(Ct(actin)-Ct(HbSUT1B))}$

In situ hybridisation. Sense and antisense probes were synthesised as described by Brunel *et al.*[28].

Tissue preparation was carried out according to the method of Brunel *et al.*[28]. Transversal sections 12 µm thick were cut with a rotary microtome, mounted onto SuperFrost Plus slides (Fisher Scientific, Elancourt, France) and dried at 42°C for two days. Paraffin was removed through two baths (10 mins each) of Histoclear II. Slides were progressively rehydrated in an ethanol series and then washed for 5 mins in DEPC-water and then twice in PBS 1X. Slides were treated with proteinase K at 10 µg mL^{-1} in PBS 1X at 37°C for 15 mins then incubated in glycine at 0.2% in PBS 1X at room temperature for 2 mins. After two washes in PBS 1X, slides were fixed in 4% paraformaldehyde (in PBS 1X) for 10 mins, rinsed in PBS 1X and then acetylated using 0.5% acetic anhydride in 0.1 M triethanolamine for 10 mins and rinsed in PBS 1X. Before hybridisation, sections were dehydrated in an ethanol series. Sections were hybridised with equal concentrations (1.5 ng μL^{-1}) of either sense or antisense probes in 1X Denhart's, 10% dextran sulfate, 1 mg mL^{-1} tRNA, 50% formamide, 1X salts (300 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 6.8, 10 mM NaH_2PO_4, 10 mM Na_2HPO_4, 5 mM EDTA) and incubated at 50°C overnight in a humid chamber. Sections were washed twice in 2X SSC, six times in 0.1X SSC for 15 mins at 42°C each and twice each in 1X PBS for 10 mins at room temperature. The detection of DIG-labeled probes was performed as reported by Poupard *et al.*[29] using an anti-digoxigenin alkaline phosphatase conjugate. After suitable colour development the reaction was halted by rinsing in water and the sections were fixed onto slides, dried and mounted in Eukitt. Observations were performed under a Zeiss Axioplan 2 microscope and using an AxioCam HR camera (Zeiss) with the AxioVision digital imaging software.

Promoter cloning and sequence analysis. To clone the promoter of the *HbSUT1B* gene, the GenomeWalker Universal kit (Clontech, Mountain View, USA) was used according to

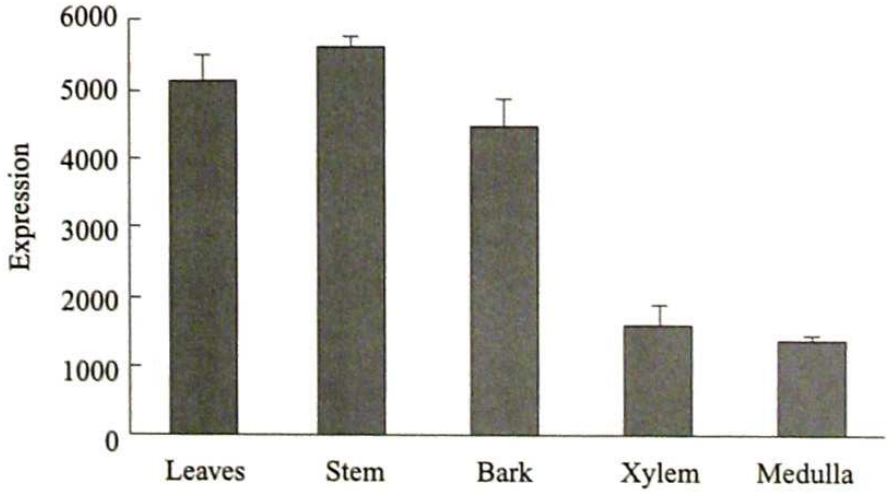


Figure 1. Expression pattern of HbSUT1B *sucrose transporter in several organs of young* Hevea *trees of PB 217. All trees were cut back 6 months before and kept in a controlled room.*

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

Thèse Anaïs Dusotoit-Coucaud, 2009

the manufacturer's instructions. The sequences obtained were *in silico* analysed with the website PLACE (http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/signalscan.html).

RESULTS

HbSUT1B Transcript Accumulation in Different Organs of PB 217

The level of *HbSUT1B* transcripts was monitored in different organs of young rubber trees (cut back 6 months earlier) from PB 217 grown in a controlled environment room. The leaves, stem, bark, xylem and medulla were harvested in order to provide a picture of the *HbSUT1B* expression pattern in the tree. It is known that sucrose transporters belonging to the SUT1 group (like *HbSUT1B*) are not organ-specific but most of them are expressed in sink tissues[18,19,30].

As shown in *Figure 1*, *HbSUT1B* was expressed in both sources namely photosynthetic leaves and sink (stem) organs. In the stem tissue, *HbSUT1B* transcripts were feebly accumulated in xylem and medulla, but highly accumulated in bark tissue where latex cells are located and rubber biosynthesis occurs.

RNAs Localisation by *in-situ* Hybridisation

In order to provide insight into the spatial accumulation of *HbSUT1B* transcripts, *in-situ* hybridisation experiments were carried out on the same sample used for RT-PCR.

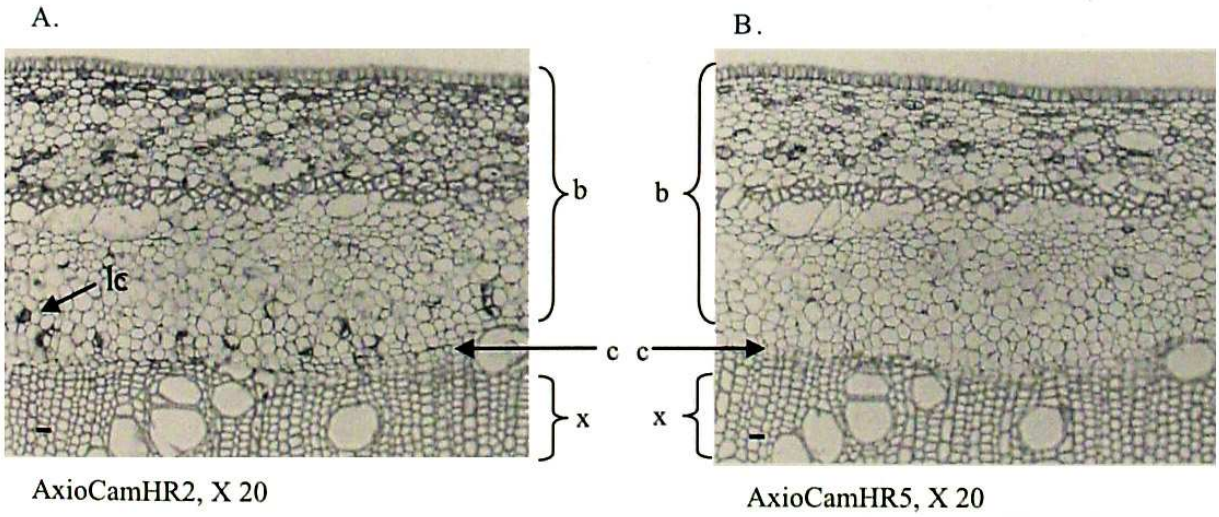


Figure 2. In-situ *localisation of* HbSUT1B *transcripts in stem of young* Hevea *(cut back 6 months before) grown in a controlled room.*
Transversal sections were obtained and hybridised with (A) HbSUT1B *antisense mRNA probe, (B)* HbSUT1B *sense mRNA probe as a negative control.*
Positive hybridisation signals are visualised by violet staining using a digoxigenin-labelled RNA immunodetection system as described in materials and methods.
Bark (b), xylem (x), latex cells (lc), cambium (c).
Bars in figures A and B = 50 µm.

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

Thèse Anaïs Dusotoit-Coucaud, 2009

Journal of Rubber Research, Volume 12(3), 2009

In *Figure 2*, there is clearly a difference between the two pictures (A and B) respectively depicting the hybridisation with anti sense and sense probes. A typical colouration (violet staining) was detected in *Figure 2A*, whereas no signal could be observed in *Figure 2B*, demonstrating that this coloration was specific to *HbSUT1B* mRNA.

Figure 2A shows the specific accumulation of *HbSUT1B* mRNA in young phloem and cambial zone. Furthermore, some cells were completely violet. These cells may be latex ones because they were localised in the phloem, regularly differentiated and their full colouration indicated the absence of large vacuoles as in the case of laticifers.

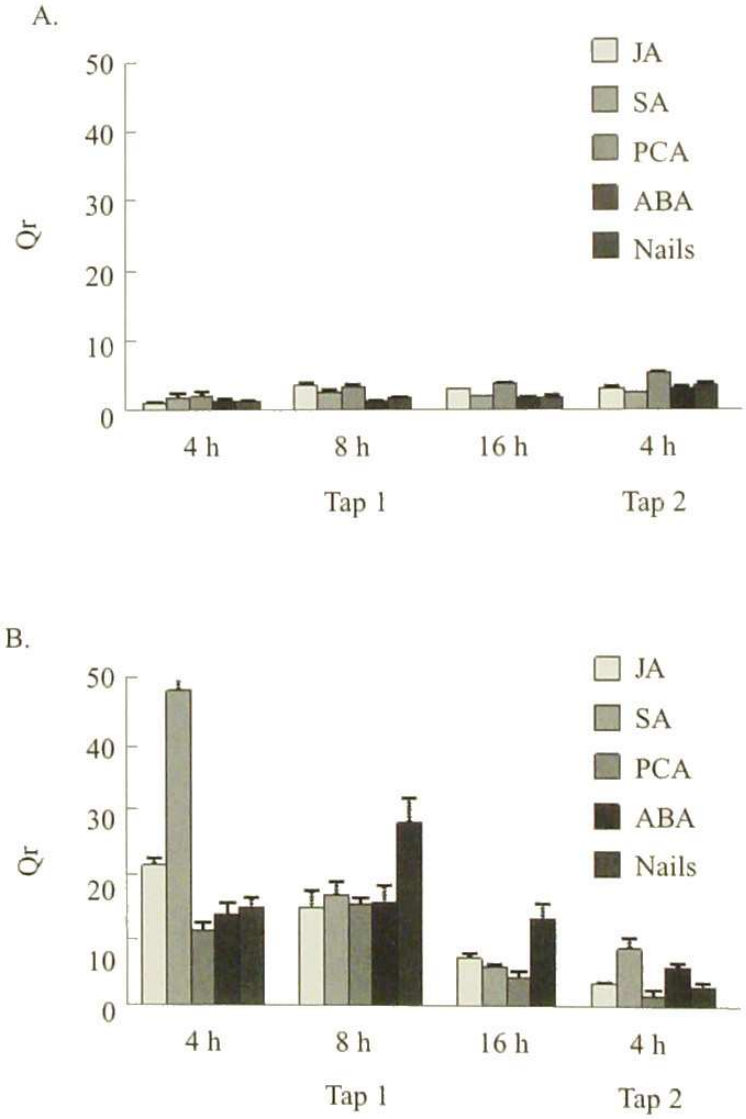


Figure 3. Chronology of the relative expression of the sucrose transporter 6 gene (HbSUT1B) *(A) in the latex and (B) in the bark of PB 217 mature virgin trees, in response to different hormonal treatments, compared to untreated trees. Actin cDNA was used as internal control.*

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

HbSUT1B Transcript Accumulation under Hormonal Treatment

In order to enhance the characterisation of *HbSUT1B* regulation, several field hormonal treatments were performed on mature trees. Our previous data showed that *HbSUT1B* is regulated by wounding and ethylene[25]. The present study further analyses whether *HbSUT1B* transcript accumulation is responsive to certain other hormones.

Mature virgin trees (about 7 years old, neither stimulated nor tapped) from PB 217 were used. Several phytohormones were directly applied on bark: (i) jasmonic acid (JA) which is a signal molecule involved in abiotic and biotic stress responses, and specially in wounding response[31] (ii) Salicylic acid (SA) which is known to play a key role in pathogen responses[32] (iii) Auxin (CPA) which is involved in most physiological processes such as wounding[33], and (iv) abscissic acid (ABA) because of its utility in both plant water status and abiotic stress responses[34]. Finally, to analyse the direct effects of wounding, another treatment was performed that consisted in nail sealing in the bark (in the tapped area) as far as the cambium. After all these different treatments, bark and latex samples were collected.

In latex samples (*Figure 3A*), the four tested hormones and the wounding treatment did not appear to induce any significant transcript accumulation of *HbSUT1B*, contrary to ethylene[25]. In bark samples, there was a clear and early induction by the five treatments (*Figure 3B*). JA, CPA, ABA, nails and especially SA, considerably increased the quantity of *HbSUT1B* transcripts accumulated in bark 4h after the treatment. This induction seemed to decrease with time. The effect of ABA was the only one that decreases more slowly.

Promoter Cloning

The purpose of this procedure was to obtain preliminary ideas about the molecular mechanism regulation of *HbSUT1B* transcription in response to different treatments (hormones and wounding) and to check its differential regulation observed between PB 217 and PB 260 that could reflect a difference in the promoter sequence.

The "pattern matching" approach was used to identify putative *cis*-acting regulatory elements from the promoter sequences of *HbSUT1B*. This consists in searching for each query sequence for motifs identical with or similar to previously reported *cis*-elements registered in the PLACE database.

HbSUT1B transcripts accumulation is regulated by hormones or mechanical wounding in bark tissue. An *in silico* analysis of *HbSUT1B* promoter (PHbSUT1B) indicated the presence of *cis*-acting elements putatively recognized by ABA, SA, auxin and wounding. These elements are described in detail in *Table 1*.

It has been previously shown that *HbSUT1B* transcription was responsive to ethylene treatment (Ethrel®). *HbSUT1B* exhibited a huge and early transient up-regulation in latex of both PB 217 and PB 260 after ethylene treatment[25]. PB 217 is characterised by a low-medium metabolism and a high sugar loading, whereas PB 260 presents a high metabolism and a medium sugar loading[25,36–38]. The comparison of *HbSUT1B* promoter sequences from PB 217 and PB 260 over a sequence fragment comparable in length reveals that both promoter sequences are strictly identical (data not shown). The difference of *HbSUT1B* transcript accumulation between PB 217 and PB 260 may not be explained by a transcriptional regulation[25].

TABLE 1. POTENTIAL *CIS*-ACTING REGULATORY ELEMENTS IDENTIFIED IN PHbSUT1B FROM PB 217 AND PB 260 BY *IN SILICO* "PATTERN MATCHING" SEARCH AGAINST THE PLACE DATABASE

Cis-element	Associated transcription factor	Number of copies	Expected function	Reference
MYC	ATMYC2/ ICE1	10	ABA-regulated expression	40
MYB		12	ABA-regulated expression	40
E-box		10	Light/ABA-regulated expression	41
DOF	Dof protein (1 Zn finger)	8	Auxin-regulated expression	42
GT-1	GT-1 like factor	7	Light/Salicylic acid-regulated expression	43
WRKY/W-box	WRKY	20	Wounding/Salicylic acid/ sugar-regulated expression	44
AGAA-motif		5	Expression in pollen	45
CTCTT-motif		8	Expression in root nodules	46

Several unexpected *cis*-acting elements were found following the *in silico* analysis: AGAAA-motifs (specific expression in pollen) and CTCTT-motifs (specific expression in root nodules). These *cis*-acting elements have already been identified in the promoter of hevein gene[39].

DISCUSSION

Previous studies reported that sucrose transporters are involved in a variety of physiological processes in herbaceous species[22,18–47] as well as in woody species[19]. Moreover, other studies have shown that the presence of sucrose transporters is essential for laticifers functioning[35,48–50]. As an initial step towards exploring the involvement of sucrose transporters in latex yield, the ethylene effects on the expression of seven sucrose transporters isoforms have been analysed[25]. We hypothesised that *HbSUT1B* could be linked to latex yield. As a result, we provided initial insight into the molecular study of the *HbSUT1B* gene regulation. Our present goal was to identify factors regulating *HbSUT1B*, which may have an impact on latex production.

Firstly, the profiling accumulation of *HbSUT1B* transcripts in virgin *Hevea* trees was investigated, using RT-PCR on cDNA from several organs. Our data showed that *HbSUT1B* transcripts were abundantly expressed in leaves and stems (*Figure 1*). Several other plant sucrose transporters have been described to be expressed in both source and sink organs. *AgSUT1* transcripts (*Apium graveolens* Sucrose Transporter 1) are detected in leaves and roots[51] or *StSUT1* transcripts (*Solanum tuberosum* Sucrose transporter 1) are present in leaves, roots and flowers[52]. In addition, with regards to stem tissue, the *HbSUT1B* transcripts were preferentially localised in bark (*Figure 1*). *In-situ* hybridisation analysis indicated that these *HBSUT1B* transcripts were localised in young phloem, cambial zone and presumably in latex cells of young stems (*Figure 2*). According to these results,

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

Thèse Anaïs Dusotoit-Coucaud, 2009

HbSUT1B transcripts seem to be preferentially localised in latex synthesis sites (latex cells), and might be involved in the production of rubber. Similarly, *HEV2.1* (Hevein 2.1 gene of *Hevea brasiliensis*) known to be implied in rubber biosynthesis, has been reported as being specifically expressed in latex cells according to *in situ* hybridisation data[53].

We have previously shown that *HbSUT1B* transcript level in latex is sensitive to ethylene treatment[25]. To check whether this response is ethylene-specific, the impact of various hormones on transcript level of *HbSUT1B* was analysed by real time RT-PCR, on virgin mature PB 217 trees. *HbSUT1B* expression was not regulated by the hormones tested in latex cells, but significantly increased by JA, PCA, ABA, Nails and especially SA in bark. Although latex cells are localised within the bark, our data indicates that the regulation mechanisms of *HbSUT1B* differ between these two compartments. In fact, *HbSUT1B* was found to be up-regulated only by ethylene[25] in latex cells, whereas it was sensitive to all hormonal and wound treatments in bark. There are limited data about differential regulation of genes between latex and bark tissues. However, there is the noticeable case of glutamine synthetase, in that this gene is up-regulated by ethylene only in latex[54]. Another example is the rubber elongation factor regulation, *i.e.*, this gene is regulated by the development state of the tree, but differentially in latex and in bark[55].

The first purpose of the promoter cloning was to obtain preliminary ideas about molecular mechanism regulation of *HbSUT1B* in response to hormonal or wounding treatments (*Figure 3*). *HbSUT1B* transcripts are accumulated in bark tissue after hormonal treatments. After *in silico* analysis of the PHbSUT1B sequence (Promoter of *HbSUT1B*), no *cis*-acting elements directly implied in response to hormones (like ABRE or JASE) was identified. However, some other *cis*-acting elements might be involved in the *HbSUT1B* response to hormones. Firstly, MYB and MYC have already been depicted as ABA-response elements, for example, the *AtMYC2* and *AtMYB2* function as transcriptional activators in ABA signalling[40]. Secondly, DOF boxes are found in PHbSUT1B and they could intervene in auxin response, like in *Nicotiana tabacum*[56]. In addition, some GT-1 (GT-1 consensus) and WRKY (WBOXATNPR1) elements have been presented as SA-regulated elements[57–58]. Finally, a large number of wounding boxes (W-box and WRKY) were identified in PHbSUT1B. In conclusion, the promoter analysis appeared to indicate that *HbSUT1B* transcripts are directly regulated by wounding whereas their regulation by hormones might be indirect and complex. In short, these probably involve a great deal of hormonal cross-talk pathways.

Another point which could be discussed is the *HbSUT1B* regulation by ethylene. *HbSUT1B* transcripts have been shown to be up-regulated by ethylene in mature exploited PB 217 and PB 260 trees[25], whereas PHbSUT1B did not display any putative *cis*-acting regulatory elements from the ethylene response. Three explanations could be advanced. The cloned promoter sequence may be too small (490 bp) and there may be ethylene regulation elements upstream but it is often reported that the most significant *cis*-acting elements are in the first 500 bp. Another explanation could be that PHbSUT1B may contain unknown ethylene *cis* regulatory elements. The same case has already been observed: the *E4* gene from *Lycopersicon esculentum* is known to be regulated by ethylene, and the region of its promoter implied in this regulation has been identified. However, this promoter region did not contain any ethylene *cis*-element previously described[59]. Finally, as suggested by our *in silico* analysis,

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

Thèse Anaïs Dusotoit-Coucaud, 2009

it is possible that the PHbSUT1B does not contain any *cis*-acting element from ethylene regulation because the *HbSUT1B* transcript accumulation could be indirectly regulated by ethylene. Several wounding and stress boxes were detected in PHbSUT1B. This may mean that *HbSUT1B* is regulated by wounding and its overexpression observed after ethylene treatment may be due to the wounding and the stress caused by tapping. It could be an indirect activation by ethylene, as ethylene and wounding pathways are connected[60]. An argument in the favour of the last hypothesis is the presence of WBOXNTERF3 motifs in the PHbSUT1B. This *cis*-acting element has been described as a W box (activated by wounding) involved in ERF gene activation[61]. ERF are transcription factors involved in the ethylene pathway.

The promoter of *HbSUT1B* was cloned in two contrasted clones, *i.e.*, PB 217 is characterised by a low-medium metabolism and a high sugar loading, whereas PB 260 presents a high metabolism and a medium sugar loading[35–38]. It has been shown that the expression of *HbSUT1B* was differentially regulated by ethylene in these two clones[25]. These new results demonstrated that there is no difference in terms of promoting sequences between PHbSUT1B from PB 217 and PB 260. Thus, the differences observed in transcript quantities after ethylene treatments between both clones could be explained by a post-transcriptional regulation (at the mRNA level) or by a differential regulation upstream in the signaling pathway, for example at the transcription factor level. In the literature, it is known that sucrose transporter could be regulated at post-transcriptional level but there exists little data concerning the mechanisms of this kind of regulation. It has been shown that sucrose transporter mRNA stability is often diurnally regulated, as is the case for *StSUT1* mRNAs[62].

In conclusion, this report extends our previous work concerning the sucrose transporters from *Hevea brasiliensis* in relation to latex yield. This is the first insight into molecular regulation mechanisms of *HbSUT1B*, a sucrose transporter potentially important for latex production. *HbSUT1B* transcripts were localised in phloem cells and more precisely in latex cells while strengthening the hypothesis of their involvement in latex production. In addition, *HbSUT1B* expression was increased by JA, SA, PCA, ABA, ethylene and nails in bark but not in latex (only by ethylene). *HbSUT1B* hormonal regulation was tissue-specific. This last feature could be explained by the presence of indirect hormonal *cis*-acting elements in *HbSUT1B* promoter. We also put forward a hypothesis to explain the ethylene regulation in the absence of ethylene *cis*-acting elements in PHbSUT1B. Lastly, it is suggested that ethylene could regulate *HbSUT1B* at the post-transcriptional level (in bark tissue and in latex).

To deepen the understanding of *HbSUT1B* regulation, it would be interesting to perform *Hevea* transformations with PHbSUT1B: GFP constructs (whole or deleted promoter). Moreover, a study of the expression and regulation of *HbSUT1B* protein, by western-blot analysis and immunolocalisation seems essential to further understand *HbSUT1B* functions in the rubber tree.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to the Michelin group which supports this work. We wish to also thank SAPH (Bongo plantation/RCI) for giving us access to their plant materials and assisting in the field experiments.

Date of receipt: December 2008
Date of acceptance: March 2009

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

Thèse Anaïs Dusotoit-Coucaud, 2009

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

REFERENCES

1. GOMEZ, J.B. (1976) Comparative Ultracytology of Young and Mature Latex Vessels in *Hevea brasiliensis*. *Proc. Int. Rubb. Conf. (Rubb. Res. Inst. Malaysia, ed.)* Kuala Lumpur, **Vol. 2**, 43–164.

2. GOMEZ, J.B. AND MOIR, G.F.J. (1979) The Ultracytology of Latex Vessels in *Hevea brasiliensis*. *Monograph No. 4. Malaysian Rubb. Res. Dev. Board* (*Res. Inst. Malaysia, ed.*) Kuala Lumpur.

3. TUPY, J. (1973) The Level and Distribution Pattern of Latex Sucrose along the Trunk of *Hevea brasiliensis* Mull.Arg. as Affected by the Sink Region Induced by Latex Tapping. *Physiol. Vég.*, **11(1)**, 1–11.

4. D'AUZAC, J., JACOB, J.L. AND CHRESTIN, H. (1989) *Physiology of Rubber Tree Latex (J. d'Auzac, J.L. Jacob and H. Chrestin, eds.)* 470p. C.R.C. Press Inc.

5. ESCHBACH, J-M., TUPY, J. AND LACROTTE, R. (1986) Photosynthate Allocation and Productivity of Latex Vessels in *Hevea brasiliensis*. *Biol. Plant.*, **28(5)**, 321–328.

6. SILPI, U., LACOINTE, A., KASEMPSAP, P., THANYSAWANYANGKURA, S., CHANTUMA, P., GOHET, E., MUSIGAMART, N., CLEMENT, A., AMEGLIO, T. AND THALER, P. (2007) Carbohydrate Reserves as a Competing Sink: Evidence from Tapping Rubber Trees. *Tree Physiol.*, **27(6)**, 881–889.

7. DE FAŸ, E. AND JACOB, J.L. (1989) Anatomical Organisation of the Latex System in the Bark. *Physiology of Rubber Tree Latex (J. d'Auzac, J.L. Jacob and H. Chrestin eds.)* pp. 3–14. C.R.C. Press Inc.

8. DE FAŸ, E., HÉBANT, C. AND JACOB, J.L. (1989) Cytology and Cytochemistry of the Latex system. *Physiology of Rubber Tree Latex (J. d'Auzac, J.L. Jacob and H. Chrestin eds.)* pp. 15-29. C.R.C. Press Inc.

9. BOUTEAU, F., BOUSQUET, U., LACROTTE, R., CORNEL, D., MONESTIEZ, M. AND RONA, J.P. (1992) Sucrose/H+ and glucose/H+ Symports at the Plasma Membrane of Latex Cells and Protoplasts of *Hevea brasiliensis*. *Ind. J. Nat. Rub. Res.*, **5**, 23–37.

10. LALONDE, S., TEGEDER, M., THRONE-HOLST, M., FROMMER, W.B. AND PATRICK, J.W. (2003) Phloem Loading and Unloading of Sugars and Amino Acids. *Plant Cell Env.*, **26**, 37–56.

11. BARKER, L, KUHN, C, WEISE, A, SCHULZ, A, GEBHARDT, C, HIRNER, B., HELLMANN, H., SCHULZE, W., WARD, J.M. AND FROMMER, W.B., (2000) SUT2, A Putative Sucrose Sensor in Sieve Elements. *Plant Cell*, **12**, 1153–1164.

12. BARTH, I., MEYER, S. AND SAUER, N. (2003) PmSUC3 Characterisation of a SUT2/SUC3 Type Sucrose Transporter from *Plantago major*. *Plant Cell*, **15**, 1375–1385.

13. VAUGHN, M.W., HARRINGTON, G.N. AND BUSH, D.R. (2002) Sucrose-mediated Transcriptional Regulation of Sucrose Symporter Activity in the Phloem. *Proc. Nat. Ac. Sci.*, **99(16)**, 10876–10880.

14. SAKR, S., NOUBAHNI, M., BOURBOULOUX, A., RIESMEIER, J., FROMMER, W.B., SAUER, N. AND DELROT, S. (1997) Cutting, Ageing and Expression of Plant Membrane Transporters. *Bioch. Biophy. Acta*, **1330(2)**, 207–216.

15. ROBLIN, G., SAKR, S., BONMORT, J. AND DELROT, S. (1998) Regulation of a Plant Plasma Membrane Sucrose Transporter by Phosphorylation. *FEBS Lett.*, **424(3)**, 165–168.

16. HARMS, K., WÖHNER, R.V., SCHULZ, B. AND FROMMER, W.B. (1994) Isolation and Characterisation of P-type H(+)-ATPase Genes from Potato. *Plant Mol. Biol.*, **26(3)**, 979–988.

17. WARD, J.M., KÜHN, C., TEGEDER, M. AND FROMMER, W.B. (1998) Sucrose Transport in Higher Plants. *Int. Rev. Cytol.*, **178**, 41–71.

18. BAUD, S., WUILLEME, S., LEMOINE, R., KRONENBERGER, J., CABOCHE, M., LEPINIEC, L. AND ROCHAT, C. (2005) The AtSUC5 Sucrose Transporter Specifically Expressed in the Endosperm is Involved in Early Seed Development in *Arabidopsis*. *Plant J.*, **43**, 824–836.

19. DECOURTEIX, M., ALVES, G., BRUNEL, N., AMEGLIO, T., GUILLOT, A., LEMOINE, R., PETEL, G. AND SAKR, S. (2006) JrSUT1, A Putative Xylem Sucrose Transporter, Could Mediate Sucrose Influx into Xylem Parenchyma Cells and be Up-regulated by Freeze-thaw Cycles over the Autumn-winter Period in Walnut Tree (*Juglans regia L.*). *Plant Cell Env.*, **29(1)**, 36–47.

20. SAUER, N. AND STOLZ, J. (1994) SUC1 AND SUC2: Two Sucrose Transporters from *Arabidopsis thaliana*; Expression and Characterisation in Baker's Yeast and Identification of the Histidine-tagged Protein. *Plant J.*, **6(1)**, 67–77.

21. STADLER, R. AND SAUER, N. (1996) The *Arabidopsis thaliana* AtSUC2 Gene is Specifically Expressed in Companion Cells. *Bot. Acta* **109**, 299–306.

22. HACKEL, A., SCHAUER, N., CARRARI, F., FERNIE, A.R., GRIM, B. AND KÜHN, C. (2006) Sucrose Transporter LeSUT1 and LeSUT2 Inhibition Affects Tomato Fruit Development in Different Ways. *Plant J.*, **45(2)**, 180–192.

23. SHAKYA, R, AND STURM, A. (1998) Characterisation of Source- and Sink-specific Sucrose/H+ Symporters from Carrot. *Plant Physiol.*, **118(4)**, 1473–1480.

24. SCOFIELD, G.N., AOKI, N., HIROSE, T., TAKANO, M., JENKINS, C.L.D. AND FURBANK, R.T. (2007) The Role of the Sucrose Transporter, OsSUT1, In Germination and Early Seedling Growth and Development of Rice Plants. *J. Exp. Bot.*, **58(3)**, 483–495.

25. DUSOTOIT-COUCAUD, A., CHRESTIN, H., KONGSAWADWOARKUL, P., SOOK-MARK, U., GRANET, F. AND SAKR, S. (2007) An Insight into Laticifers Sucrose Transporters Regulation in Relation with the Ethrel®-stimulation of Latex Yield. *Proc. IRRDB Conference* (Nov. 2007) Siem Reap, Cambodia, 85–98.

26. KONGSAWADWORAKUL, P., PERET, B., PELLEGRIN, F., NANDRIS, D. AND CHRESTIN, H. (2004) The Ethylene/Cyanide Metabolic Crossroad in *Hevea* Bark and Latex. *Proc. IRRDB Seminar on Hevea Physiol. and Breeding*, (Sept 2004), Kunming, China.

27. PUJADE-RENAUD, V., PERROT-RECHEN-MANN, C., CHRESTIN, H., JACOB, J-L. AND GUERN, J. (1997) Characterisation of a Full-length cDNA Clone Encoding Glutamine Synthetase from Rubber Tree Latex. *Plant Physiol. Biochem.*, **35**, 85–93.

28. BRUNEL, N., LEDUC, N., POUPARD, P., SIMONEAU, P., MAUGET, J.C. AND VIÉMONT, J.D. (2002) KNAP2, A Class I *KN1*-like Gene is a Negative Marker of Bud Growth Potential in Apple Trees (*Malus domestica*[L.] Borkh. *J. Exp. Bot.*, **53**, 2143–2149.

29. POUPARD, P., BRUNEL, N., LEDUC, N., VIÉMONT, J.D., STRULLU, D.G. AND SIMONEAU, P. (2001) Expression of a *Bet v1* Homologue Gene Encoding a PR 10 Protein in Birch Roots: Induction by Auxin and Localisation of the Transcripts by *in-situ* Hybridisation. *Austr. J. of Plant Physiol.*, **28**, 57–63.

30. SAUER, N. (2007) Molecular Physiology of Higher Plant Sucrose Transporters. *FEBS Lett.*, **581(12)**, 2309–2317.

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

31. WASTERNACK, C. (2007) Jasmonates: An Update on Biosynthesis, Signal Transduction and Action in Plant Stress Response, Growth and Development. *Ann. Bot.*, **100**, 681–697.

32. LOAKE, G. AND GRANT, M. (2007) Salicylic Acid in Plant Defence-the Players and Protagonists. *Curr Opin. Plant Biol.*, **10(5)**, 466–72.

33. PERROT-RECHENMANN, C. AND NAPIER, R.M. (2005) Auxins. *Vitam. Horm.*, **72**, 203–233.

34. CHRISTMANN, A., MOES, D., HIM-MELBACH, A., YANG, Y., TANG, Y. AND GRILL, E. (2006) Integration of Abscisic Acid Signalling into Plant Responses. *Plant Biol. (Stuttg)*, **8(3)**, 314–25.

35. GOHET, E. (1996), La production de latex par *Hevea brasiliensis*, relations avec la croissance. Influence de différents facteurs: origine clonale, stimulation hormonale, réserves hydrocarbonées. PhD thesis, Université Montpellier II, 343p.

36. GOHET, E., KOUADIO, D., PRÉVÔT, J.C., OBOUAYEBA, S., CLÉMENT, A., D'AUZAC, J., KELI, J.Z. AND JACOB, J.L. (1997). Relation between Clone Type, Latex Sucrose Content and the Occurence of Tapping Panel Dryness in *Hevea brasiliensis*. *IRRDB Tapping Panel Dryness Workshop*, 1997/04/29–30.

37. GOHET, E., CHANTUMA, P., LACOTE, R., OBOUAYEBA, S., DIAN, K., CLEMENT DEMANGE, A., KURNIA, D. AND ESCHBACH, J.M. (2003) Latex Clonal Typology of *Hevea brasiliensis*. Physiological Modelling of Yield Potential and Clonal Response to Ethephon Stimulation. *IRRDB Workshop on Exploitation Technology*, Kottayam, India.

38. LACOTE, R., OBOUAYEBA, S., CLÉMENT-DEMANGE, A., DIAN, K., GNAGNE, M. AND GOHET, E. (2004). Panel Management in Rubber Tapping (*Hevea brasiliensis*), and Impact on Yield, Growth, and Latex Diagnosis. *J. Rubb. Res.* **7(3)**, 199–217.

39. PUJADE-RENAUD, V., SANIER, C., CAMBILLAU, L., PAPPUSAMY, A., JONES, H., RUENGSRI, N., THARREAU, D., CHRESTIN, H., MONTORO, P. AND NARANGAJAVANA, J. (2005) Molecular Characterisation of New Members of the *Hevea brasiliensis* Hevein Multigene Family and Analysis of their Promoter Region in Rice. *Bioch. Biophys. Acta*, **1727**, 151–161.

40. ABE, H., URAO, T., ITO, T., SEKI, M., SHINOZAKI, K. AND YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. (2003) *Arabidopsis* AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as Transcriptional Activators in Abscisic Acid Signaling. *Plant Cell*, **15**, 63–78.

41. TERZAGHI, W.B. AND CASHMORE, A.R. (1995) Light-regulated Transcription. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **46**, 445–474.

42. YANAGISAWA, S. AND SCHMIDT, R.J., (1999) Diversity and Similarity among Recognition Sequences of Dof Transcription Factors. *Plant. J.*, **17**, 209–214.

43. HARTMANN, U., SAGASSER, M., MEHRTENS, F., STRACKE, R. AND WEISSHAAR, B. (2005) Differential Combinatorial Interactions of *cis*-acting Elements Recognised by R2R3-MYB, BZIP, and BHLH Factors Control Light-responsive and Tissue-specific Activation of Phenylpropanoid Biosynthesis Genes. *Plant Mol. Biol.*, **57**, 155–171.

44. SUN, C., PALMQVIST, S., OLSSON, H., BOREN, M., AHLANDSBERG, S. AND JANSSON, C. (2003) A Novel WRKY Transcription Factor, SUSIBA2, Participates in Sugar Signaling in Barley by Binding to the Sugar-responsive Elements of the iso1 Promoter. *Plant Cell*, **15**, 2076–2092.

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

45. BATE, N. AND TWELL, D. (1998) Functional Architecture of a Late Pollen Promoter: Pollen-specific Transcription is Developmentally Regulated by Multiple Stage-specific and Co-dependent Activator Elements. *Plant Mol. Biol.*, **37**, 859–869.

46. FEHLBERG, V., VIEWEG, M.F., DOHMANN, E.M., HOHNJEC, N., PUHLER, A., PERLICK, A.M. AND KUSTER, H. (2005) The Promoter of the Leghaemoglobin Gene Vflb29: Functional Analysis and Identification of Modules Necessary for its Activation in the Infected Cells of Root Nodules and in the Arbuscule-containing Cells of Mycorrhizal Roots. *J. Exp. Bot.*, **56**, 799–806.

47. SIVITZ, A.B, REINDERS, A.M., JOHNSON, E., KRENTZ, A.D., GROF, C.P., PERROUX, J.M. AND WARD, J.M. (2007) *Arabidopsis* Sucrose Transporter AtSUC9: High-Affinity Transport Activity, Intragenic Control of Expression, and Early Flowering Mutant Phenotype. *Plant Physiol.* **143**, 188–198.

48. LACROTTE, R., SERRES, E., D'AUZAC, J., JACOB, J-L. AND PRÉVÔT, J-C. (1988) Sucrose Loading in Latex Cells. (*Jacob et Prévôt ed.*). *Compte-rendu du colloque exploitation-physiologie et amélioration de l'hévéa*, p.119–135.

49. LACROTTE, R., CORNEL, D., MONESTIEZ, M., CHRESTIN, H., D'AUZAC, J. AND RONA, J.P. (1988) Electrophysiological Studies of Sugar Transport Mechanisms through Plasmalemma of Latex Vessels of *Hevea brasiliensis*. Jacob et Prévôt (ed.). *Compte-rendu du colloque exploitation-physiologie et amélioration de l'hévéa*, p. 535–545.

50. LACROTTE, R., CORNEL, D., MONESTIEZ, M., CHRESTIN, H., D'AUZAC, J. AND RONA, J.P. (1989) Electrophysiological Studies of Sugar Transport Mechanisms through Plasmalemma of Latex Vessels of *Hevea brasiliensis*. *Revue Générale des Caoutchoucs et Plastiques*, **66(685)**, 66–72.

51. NOIRAUD, N., DELROT, S. AND LEMOINE, R. (2000) The Sucrose Transporter of Celery. Identification and Expression during Salt Stress. *Plant Physiol*, **222**, 1447–1455.

52. RIESMEIR, J.W., HIRNER B. AND FROMMER, W.B. (1993) Potato Sucrose Transporter Expression in Minor Veins indicates a role in Phloem Loading. *The Plant Cell*, **5**, 1591–1598.

53. MONTORO, P., LAGIER, S., BAPTISTE, C., MARTEAUX, B., PUJADE-RENAUD, V., LECLERCQ, J. AND ALEMANNO, L. (2008) Expression of the *HEV2.1* Gene Promoter in Transgenic *Hevea brasiliensis*. *Plant Cell. Tiss. Organ. Cult.*, **94**, 55–63.

54. PUJADE-RENAUD, V., CLEMENT, A., PERROT-RECHENMANN, C., PREVOT, J-C., CHRESTIN, H., JACOB J-L. AND GUERN, J. (1994) Ethylene induced Increase in Glutamine Synthetase Activity and mRNA Levels in *Hevea brasiliensis* Latex Cells. *Plant Physiol.*, **105**, 127–132.

55. PRIYA, P., VENKATACHALAM, P. AND THULASEEDHARAN, A. (2007) Differential Expression Pattern of Rubber Elongation Factor (REF) mRNA Transcripts From High and Low Yielding Clones of Rubber Tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.). *Plant Cell Rep.*, **26**, 1833–1838.

56. BAUMANN, K., DE PAOLIS, A., GUALBERTI, P.C. AND GUALBERTI, G. (1999) The DNA Binding Site of the Dof Protein NtBBF1 is Essential for Tissue-specific and Auxin-regulated Expression of the Rolb Oncogene In Plants. *Plant Cell*, **11**, 323–334.

57. BUCHEL, A.S., BREDERODE, F.T., BOL, J.F. AND LINTHORST, H.J.M. (1999) Mutation of GT-1 Binding Site in the *Pr-1A* Promoter Influences the Level of Inducible Gene Expression *in vivo*. *Plant. Mol. Biol.*, **40**, 387–396.

58. YANG, P., CHEN, C., WANG, Z., FAN, B. AND CHEN, Z. (1999) A Pathogen- and

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

Salicylic Acid-induced WRKY DNA-binding Activity Recognises the Elicitor Response Element of the Tobacco Class I Chitinase Gene Promoter. *The Plant J.*, **18(2)**, 141–149.

59. MONTGOMERY, J., GOLDMAN, S., DEIKMAN, J., MARGOSSIAN, L. AND FISCHER, R.L. (1993) Identification of an Ethylene-responsive Region in the Promoter of a Fruit Ripening Gene. *Prc. Nat. Ac. Sci.*, **90**, 5939–5943.

60. FUJITA, Y., NOUTOSHI, Y., TAKAHASHI, F., NARUSAKA, Y. AND SHINOZAKI, K. (2006) Crosstalk between Abiotic and Biotic Stress Responses: A Current View from the Points of Convergence in the Stress Signaling Networks. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **9(4)**, 436–442.

61. NISHIUCHI, T., SHINSHI, H. AND SUZUKI, K. (2004) Rapid and Transient Activation of Transcription of the ERF3 Gene by Wounding in Tobacco Leaves: Possible Involvement of NtWRKYs and Autorepression. *J. Biol. Chem.*, **279**, 55355–55361.

62. KUHN, C., FRANCESCHI, V.R., SCHULZ, A., LEMOINE, R. AND FROMMER W.B. (1997) Macromolecular Trafficking Indicated by Localisation and Turnover of Sucrose Transporters in Enucleate Sieve Elements. *Science*, **275**, 1298–1300.

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

Cette seconde partie du chapitre sur les transporteurs de sucres, nous a permis de mettre en évidence l'implication potentielle de *HbSUT1B* et *HbHXT1* dans la production du latex chez les arbres exploités. En effet, la stimulation de la production en réponse à l'éthylène apparaît liée à la régulation des profils d'expression de ces deux isoformes de transporteurs de sucre par l'éthylène, avec une forte accumulation dans les cellules laticifères, chez le clone fortement stimulé PB217. Cette hypothèse est en accord avec les résultats obtenus chez le clone PB260, où l'application de l'éthylène ne s'accompagne d'aucune stimulation très significative de l'expression de ces deux transporteurs, mais conduirait plutôt à un détournement du saccharose vers l'écorce, au détriment des cellules laticifères. Ces données moléculaires suggèrent l'implication de *HbSUT1B et HbHXT1* dans la variabilité clonale entre PB217 et PB260, en terme de production de latex après stimulation à l'éthylène.

Enfin, la comparaison des résultats obtenus sur arbres vierges et sur arbres exploités du clone PB217 a révélé un phénomène d'acclimatation de la physiologie des cellules laticifères au stress répété de la saignée. En effet, les isoformes de transporteurs de sucres mobilisés en réponse à l'éthylène sont différentes chez les arbres vierges (*HbSUT2A* et *HbSUT1A*) et chez les arbres exploités (*HbSUT1B* et *HbHXT1)* du même clone PB217.

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

CONCLUSIONS

Dans ce chapitre, nous avons présenté la partie de notre travail axée sur les transporteurs de sucres (saccharose et hexoses) des cellules laticifères d'*Hevea brasiliensis.* Le but de cette partie était d'obtenir les premières données moléculaires sur les transporteurs de sucres des cellules laticifères, qui sont considérés comme des facteurs potentiellement limitant de la production de latex. Les résultats obtenus nous ont permis de mettre en évidence les points essentiels suivants :

- Les cellules laticifères présentent un équipement important et varié de transporteurs de saccharose. Sept isoformes de transporteurs putatifs de saccharose ont été clonées, reparties dans les trois groupes décrits de transporteurs de saccharose : *HbSUT1A*, *HbSUT1B* (groupe 1) ; *HbSUT2A*, *HbSUT2B*, *HbSUT2C* (groupe 2) et *HbSUT4*, *HbSUT5* (groupe 4).
- Un transporteur d'hexoses a également été cloné dans les mêmes cellules : *HbHXT1*.
- Les huit transporteurs de sucres clonés, sont co-exprimés différentiellement dans les cellules laticifères et l'écorce des deux clones d'hévéa PB217 et PB260.
- Chez des arbres vierges du clone PB217, l'expression de deux isoformes de transporteur de saccharose *HbSUT1A* et *HbSUT2A* semble être liée à la stimulation de la production de latex par l'éthylène.
- Les résultats d'hybridation *in situ* indiquent que les transcrits de *HbSUT1A* et *HbSUT2A* sont localisés dans la zone phloémienne et dans les cellules laticifères.
- Chez des arbres exploités (PB217 et PB260), l'expression des isoformes de transporteur de sucre *HbSUT1B et HbHXT1* semble liée à la stimulation de la production de latex par l'éthylène.
- La régulation différentielle par l'éthylène de l'accumulation des transcrits de *HbSUT1B* et *HbHXT1* pourrait rendre compte de la variabilité clonale entre PB260 et PB217, concernant la stimulation éthylénique de la production de latex.
- On observe un phénomène d'acclimatation des arbres à l'exploitation (saignée) : les profils d'expression des transporteurs de sucres sont modifiés en fonction de l'état d'exploitation des arbres.

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

Chapitre 2 : Les transporteurs de polyols des cellules laticifères

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

Ce chapitre est consacré à l'expression et aux rôles potentiels des transporteurs de polyols dans la production de latex. Les résultats obtenus ont permis l'initiation de la rédaction d'une publication intitulée « Clonage of a new polyol transporter from latex cells of rubber tree : possible involvement in ethylene-stimulated latex production », encore en préparation.

L'analyse biochimique du latex, cytoplasme des cellules laticifères, révèle que le saccharose est le sucre soluble le plus abondant mais que le quebrachitol est la molécule carbonée la plus importante après le caoutchouc (Bealing 1969, 1981; Low, 1978). Ce polyol cyclique à six carbones, dérivé du *myo*inositol, représente 1 % en poids/volume du latex. Si le rôle du saccharose comme précurseur de biosynthèse du caoutchouc est très bien décrit, celui du quebrachitol dans les cellules laticifères reste peu clair. Le premier rôle attribué au quebrachitol est celui d'osmorégulateur : il maintiendrait la pression de turgescence indispensable à l'efflux du latex (Sheldrake, 1978). Son accumulation dans les cellules laticifères induirait une entrée d'eau depuis les cellules environnantes, ce qui permettrait de maintenir la pression de turgescence des cellules laticifères, responsable de l'écoulement du latex. Le quebrachitol, accumulé en grande quantité, pourrait aussi intervenir dans le processus de coagulation. Il favoriserait l'éclatement des lutoïdes qui contiennent les enzymes de la coagulation (Low, 1978). Il a aussi été proposé que le quebrachitol puisse intervenir dans la biosynthèse du caoutchouc (Bealing, 1969), mais cette hypothèse n'est pas communément admise.

Bien que le quebrachitol joue un rôle central dans la physiologie des cellules laticifères, aucune information n'est disponible quant aux modalités de son absorption par ces cellules. Au vu des données bibliographiques et des résultats préliminaires obtenus sur les cellules laticifères, deux hypothèses nous semblent possibles. L'absorption de quebrachitol serait réalisée soit par des transporteurs spécifiques de ce polyol cyclique, comme c'est le cas pour les transporteurs de *myo*inositol (Chauhan *et al.*, 2000 ; Schneider *et al.*, 2006), soit par des transporteurs de polyols de type « *AtPLT5* » récemment identifiés chez *Arabidopsis* (Reinders *et al.*, 2005 ; Klepek *et al.*, 2005). Cette dernière hypothèse repose sur les résultats des études d'électrophysiologie indiquant la capacité des cellules laticifères à absorber divers types de molécules carbonées : saccharose, pentoses, hexoses, polyols…(Bouteau *et al.*, 1999). Dans ce contexte, deux types de transporteurs ont été recherchés : les transporteurs de polyols cycliques (de type myoinositol) et des transporteurs de polyols de type « *AtPLT5* ».

Notre objectif ici, était d'identifier des transporteurs de polyols des cellules laticifères, de les caractériser et d'estimer leur implication éventuelle dans la production de latex. Le

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

schéma expérimental a été le même que pour les transporteurs de saccharose et d'hexoses. Après un criblage de banque d'ADNc de latex à l'aide de sondes homologues, deux transporteurs putatifs de polyols ont été isolés. Leur implication potentielle dans la production de latex a été estimée par l'étude de leur expression dans des conditions de production contrastées aussi bien chez les arbres vierges que chez les arbres exploités du même clone PB217. Des études complémentaires ont également été réalisées en termes d'expression dans les différents organes de la plante, de réponse à des traitements divers, de localisation de transcrits par hybridation *in situ*, et de localisation de protéines par immunolocalisation *in situ*. Toutes ces expérimentations ont permis de mettre en évidence l'existence de deux isoformes de transporteurs putatifs de polyols *HbPLT1* et *HbPLT2*, ayant un rôle différentiel dans la production du latex ; et ont abouti à l'écriture d'un quatrième article : « Cloning And Characterization Of A New Polyol Transporter (HbPLT2) In *Hevea Brasiliensis* **».** Cet article sera prochainement soumis au journal *Plant and Cell Physiology***.**

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

ORIGINAL ARTICLE

Cloning And Characterization Of A New Polyol Transporter (HbPLT2) In *Hevea Brasiliensis*

Anaïs Dusotoit-Coucaud[(1,2)], Benoit Porcheron [(2)], Nicole Brunel[(1,2)], Panida Kongsawadworakul[(4)], Jérôme Franchel[(1,2)], Unshira Viboonjun[(4)], Hervé Chrestin[(4,5)], Rémi Lemoine[(3)], Soulaïman Sakr[(1,6)*]

[(1)]Clermont Université, Université Blaise Pascal, UMRA 547 PIAF, F-63177 Aubière

[(2)] INRA, UMRA 547 PIAF, F-63100 Clermont-Ferrand

[(3)] FRE 3091 PHYMOTS, Université de Poitiers, 40 avenue du Recteur Pineau, 86022 Poitiers cedex, France.

[(4)] Department of Plant Science, Faculty of Science, Mahidol University, Rama 6 Road, Bangkok 10400, Thailand.

[(5)] Institut de Recherche pour le Développement (IRD), UR060/CEFE-CNRS, 1029 route de Mende, 34032, Montpellier, France.

[(6)] Agrocampus Ouest, Centre d'Angers, UMR SAGAH, IFR QUASAV 149, 2 rue le Nôtre, 49045 Angers Cedex, France.

Running title: New polyol transporters in rubber trees

* Corresponding author: Soulaïman Sakr

Tel.: +33 (0)2 41 22 54 24;

E-mail: soulaiman.sakr@agrocampus-ouest.fr

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

Abstract

Quebrachitol is a cyclic polyol and, along with sucrose, is one of the main sugars transported in the *Hevea brasiliensis*. However, in contrast to sucrose, mechanism and regulation of quebrachitol absorption is still unknown. Upon screening latex-derived cDNA-library using polyol transporter-specific probes, two full length cDNAs were isolated, and named *HbPLT1* and *HbPLT2* (for *Hevea brasiliensis* Polyol Transporter 1 and 2, respectively). Their respective sequences exhibited close similarity with the previously cloned acyclic sugar polyol transporters, and shared the main features of the Major Facilitative Superfamily. The functional activity of one of the cDNA was determined by using an HbPLT2-complemented yeast strain. These strains displayed a marginal absorption of cyclic (inositol) and acyclic (mannitol and sorbitol) polyol but no absorption of sucrose, hexose and glycerol. Active absorption for xylitol was detected, and was competitively inhibited by quebrachitol. *HbPLT1* and *HbPLT2* expression patterns varied in response to different stimuli. Bark treatment with ethylene resulted in an early and significant up-regulation of *HbPLT2* transcripts in laticifers as well as in inner bark cells, when compared to *HbPLT1*. Other treatments, especially mechanical wounding, strongly induced *HbPLT2* transcripts. These data were consistent with the presence of ethylene and a wound-responsive regulatory *cis*-element on the sequence of the *HbPLT2* promoter. All these findings together with those recently obtained for sucrose transporters and aquaporins are discussed in relation to the different roles for quebrachitol in the physiology of the *hevea brasiliensis*.

Keywords: polyol transporter, *Hevea brasiliensis*, quebrachitol, latex production.

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

1

The nucleotide sequence reported in this paper has been submitted to EMBL Nucleotide Sequence Database under accession numbers: *HbPLT1*: AM924132 et *HbPLT2*: AM924133

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

INTRODUCTION

In many polyol-translocating plants, the existence of an energy-dependent H^+/polyol cotransporter in the plasma membrane was initially proposed on the basis of physiological considerations (Daie et al. 1986, 1988, Salmon et al. 1995, Maurel et al. 2004). These were subsequently confirmed by the isolation of the first cDNA encoding a mannitol transporter in celery phloem (*AgMAT1*: *Apium graveolens* Mannitol Transporter 1; Noiraud et al. 2001a) and thereafter, the identification of many other polyol transporters such as sorbitol (Gao et al. 2003, Ramsperger-Gleixner et al. 2004, Watari et al. 2004) and mannitol transporters (Noiraud et al. 2001a, Juchaux-Cachau et al. 2007). These polyol transporters are members of the major facilitator super family (MFS, Marger and Saier 1993) and feature the same main characteristics as the previously isolated disaccharide and monosaccharide transporters in plants. They are expressed in both source and sink tissues. For instance, *PmPLT1* and *PmPLT2* (*Plantago major* PoLyols Transporter 1& 2) are present in companion cells of photosynthetically-active leaves, where they catalyze sorbitol loading into the *Plantago* phloem (Ramsperger-Gleixner et al. 2004). *PcSOT1* and *PcSOT2* (*Prunus cerasus* SOrbitol Transporter 1 and 2) are preferentially expressed in sink organs. *PcSOT1* is present in expanding leaves and in fruit, and its higher expression coincides with higher sorbitol unloading. *PcSOT2* expression is mainly limited to the early stage of fruit development (Gao et al. 2003).

Sequences homologous to *AgMAT1* have recently been identified by Noiraud et al. (2001b) in polyol non-transporting plants such as Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*), sugar beet (*Beta vulgaris*) and rice (*Oryza sativa*), and among these cDNAs, only one isoform (*AtPLT5*) has been functionally characterized in the yeast system (Klepek et al. 2005, Reinders et al. 2005). *AtPLT5* (*Arabidopsis thaliana* polyol transporter 5) was found to transport a large variety of carbohydrates, including acyclic polyols (mannitol and sorbitol), trioses (glycerol), pentoses (ribose) and hexoses (glucose). Cyclic polyol transporters have also been isolated from plants. The first cDNAs of cyclic transporters (myoinositol transporters) were cloned from ice plants (*Mesembryanthemum crystallinum*, Chauhan et al. 2000) and then from *Arabidopsis thaliana* (Schneider et al. 2006, 2007), only two of them being satisfactorily described. For example, AtINT2 (*Arabidopsis thaliana* Inositol Transporter) mediates the symport of H^+ and several inositol epimers, including myo-inositol, scyllo-inositol, D-chiro-inositol and muco-inositol, with medium affinity for myo-inositol (Schneider et al. 2007).

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

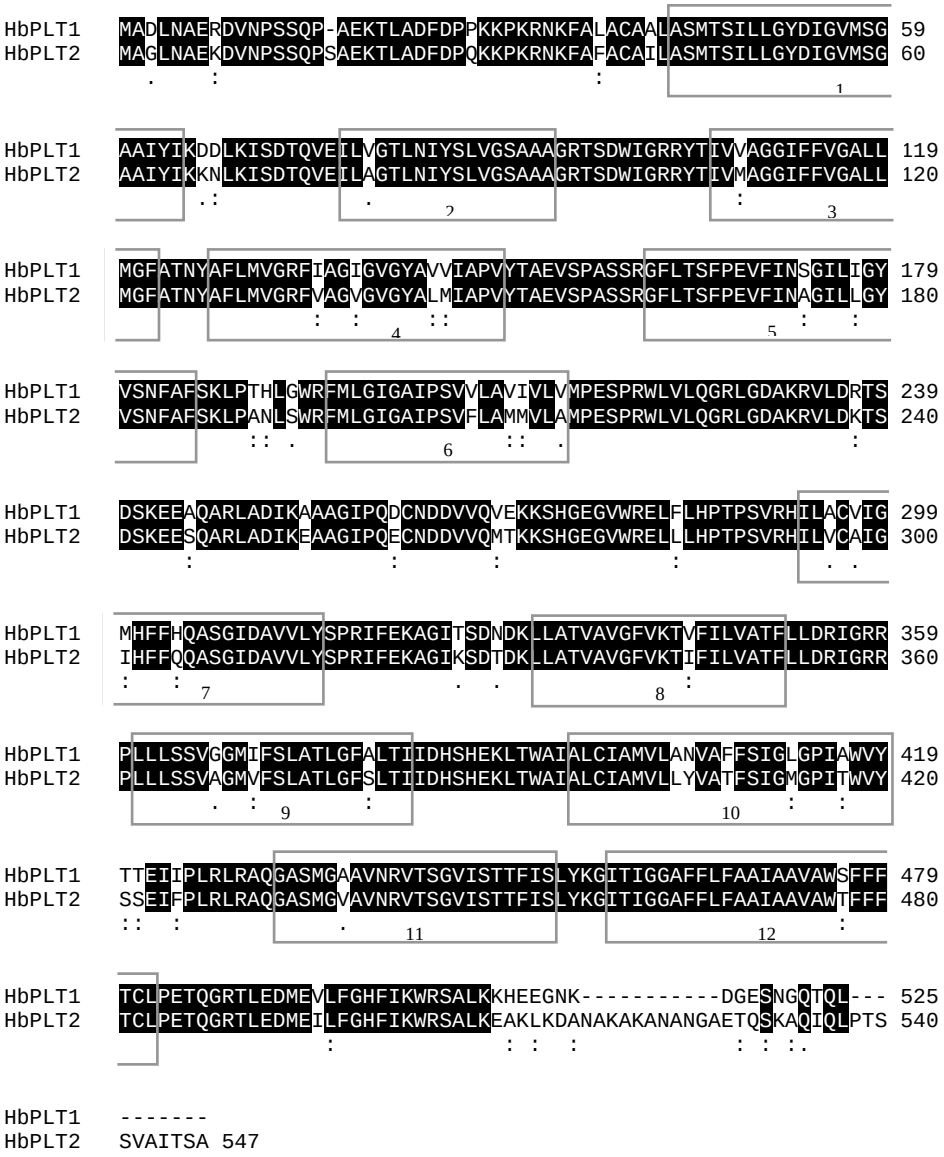


Figure 1 : Comparison of the deduced amino acid sequences of HbPLT1 and HbPLT2.

Both sequences were predicted with Expasy website (http://www.expasy.ch/tools/dna.html) and then aligned with clustalW (http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html).
Black highlighted amino-acids (aa) represent identical aa

: means that conserved substitutions have been observed

. means that semi-conserved substitutions are observed

Quebrachitol is a cyclic polyol that is present in a small number of genera, including that of *Hevea brasiliensis*, a crop of considerable economic significance in natural rubber (cis-polyisoprene) production (Bealing 1981). The process of production occurs in the cytoplasm (latex) of laticifers and is very much boosted by Ethrel® treatment (an ethylene releaser, d'Auzac and Ribaillier 1969). Analyses of latex sugars have revealed that quebrachitol is the predominant carbon compound after rubber (Bealing 1969, 1981), and that sucrose is the most abundant soluble sugar (Buttery and Boatman 1966). In accordance with their high concentrations, many roles have been attributed to these sugars. Sucrose is the unique precursor of rubber synthesis (d'Auzac 1964a, Chow et al. 2007). It participates in the generation of laticifer turgor pressure (Buttery and Boatman 1966) and its intracellular concentration is used to evaluate the metabolic activity of these cells (Jacob et al. 1989). Although its involvement in rubber synthesis is still a matter of debate (Bealing 1969), quebrachitol contributes significantly to the formation and maintenance of turgor pressure, which is essential for latex outflow after tapping events (Sheldrake 1978). Because laticifers are apoplastically-isolated from the neighboring cells of soft bark (Hébant and de Faÿ 1980), nutrients must be imported *via* the apoplast, through specific plasma membrane transporters. In support of this hypothesis, seven putative sucrose transporters were cloned from a latex-derived cDNA library of mature virgin trees, suggesting that laticifers may function as highly active sites of sucrose absorption (unexploited trees, Dusotoit-Coucaud et al. 2009b). However, only *HbSUT1A* and *HbSUT2A* (two sucrose transporters of *H. Brasiliensis*) were reported to be markedly and specifically up-regulated by ethylene, and this response was correlated with the ethylene-stimulated latex production. It has been proposed that *HbSUT1A* and *HbSUT2A* mediate the increased transport of sucrose into laticifers (Lacrotte et al. 1985), required for the ethylene stimulation of rubber synthesis. Besides sucrose transporters, two aquaporins (*HbPIP2,1* and *HbTIP1,1* for plasma membrane intrinsic protein and tonoplast intrinsic protein, respectively) were cloned from a cDNA library of inner liber tissue, and reported to be expressed in laticifers (Tungngoen et al. 2009). Detailed characterization of their response to ethylene application gave grounds for the hypothesis of ethylene-induced latex dilution, through an up-regulation of *HbPIP2,1* transcript and protein (Tungngoen et al. 2009). Ethylene-induced latex production could thus result from an increase in both rubber synthesis and the degree of latex dilution. Because quebrachitol markedly contributes to the osmotic force of inner bark tissue, including laticifers, its importation into laticifers appears to be of considerable importance for the ethylene stimulation of latex production.

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

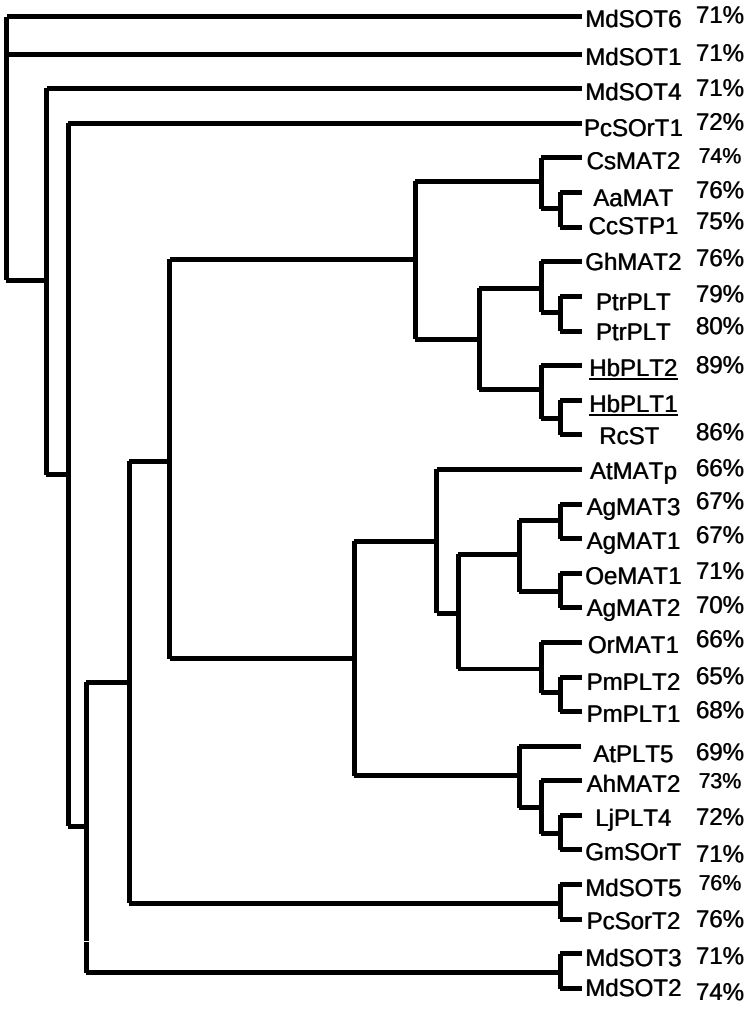


Figure 2 : Comparison of amino acid sequences of polyol transporters.

The dendogram was generated by comparison of confirmed and predicted plant polyol transporter sequences from public databases (EMBL/GenBank/DDBj). The *Hevea brasiliensis* polyol transporters (HbPLT1 and HbPLT2) are underlined. The percentage identity is noted on the right.

The main goal of this research study was to identify the quebrachitol transporters from a latex-cDNA library and to gain information on its contribution to the ethylene-enhanced latex yield. To this end, this study was performed on unexploited (mature virgin) trees, treated or not with Ethrel®, the latex yield stimulant used worldwide to increase rubber yield in numerous rubber plantations (Abraham et al. 1968, d'Auzac and Ribaillier 1969). In addition, all of these experiments were carried out on the same samples of latex and bark tissues as those used for our recent work focusing on sucrose transporters (Dusotoit-Coucaud et al. 2009b) and aquaporins (Tungngoen et al. 2009). By assembling the data described here and those from sucrose transporters (Dusotoit-Coucaud et al. 2009b) and aquaporins (Tungngoen et al. 2009), we propose a draft outline of the involvement of this plasma membrane protein in the stimulation of latex yield by means of Ethrel® application to virgin trees.

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

RESULTS

Cloning cDNAs of putative polyol transporters (*HbPLT1* and *HbPLT2*) from latex

Degenerated oligonucleotide primers from conserved regions of polyol transporter cDNAs from different species (mannitol transporters, sorbitol transporters, *AtPLT5*) were used to clone two PCR products (550 and 850 bp, respectively) from latex and inner bark tissue. After their sequencing, these PCR products were used to screen a latex cDNA library, resulting in the isolation of two full-length cDNAs encoding putative polyol transporters. These genes were referred as to *Hevea brasiliensis* Polyol Transporter 1 and 2 (*HbPLT1* and *HbPLT2*) and were registered in the EMBL/GenBank/DDBJ under the accession numbers AM924132 and AM924133, respectively.

Their complete nucleotide sequences harbor an open reading frame of 1581 bp for *HbPLT1* and 1644 bp for *HbPLT2*. The predicted proteins (Fig. 1) are 525 amino acids (HbPLT1) and 547 amino acids (HbPLT2) long, respectively. In addition, they share the main characteristics of the Major Facilitative Superfamily (MFS), and their hydrophobicity profiles are in accordance with the existence of twelve transmembrane domains and ten connecting loops.

At the nucleotide sequence level, *HbPLT1* and *HPLT2* have 88% similarity within the coding region and only 53% in the 3'untranslated region (3'-UTR). At the protein sequence level, HbPLT1 and HbPLT2 show 89% identity. Moreover, the identity between HbPLTs (1 and 2) and the previously isolated polyol transporters ranges from 77% to 65% (Fig. 2). The greatest

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

Added compound	HbPLT2-expressing yeast (% of xylitol uptake)	AgMaT1-expressing yeast (% of xylitol uptake)
Sugar alcohol		
Xylitol	100	100
Mannitol	10*	91
Sorbitol	13*	77*
Inositol	14*	
Glycerol	0*	
Sugar		
Sucrose	0*	
Glucose	0*	
Fructose	0*	
Xylose	3*	
Xylitol + CCCP 10^{-5}M	34*	39*
Xylitol		
+ 1 mM Quebrachitol	82*	
+ 5 mM Quebrachitol	68*	93
+ 10 mM Quebrachitol	53*	

Table 1: Active uptake of various sugar alcohol (myo-inositol, sorbitol, mannitol, glycerol and xylitol) and sugars (sucrose, glucose, fructose and xylose) by yeast expressing HbPLT2.

The data are calculated as uptake of substrate (0.5 mM concentration) in yeast expressing HbPLT2 minus the uptake in yeast expressing the empty plasmid (4 replicates per condition). The uptake of xylitol in HbPLT2 expressing yeast was taken as 100 % (10.2 nmol.mg protein^{-1}.2 min^{-1}) and the uptake rates of various substrates or of xylitol in various conditions are expressed as % of xylitol uptake. Some of these experiments were run in parallel in yeast expressing AgMaT1 (Noiraud et al., 2001a, same calculations with 100% xylitol uptake being 9.8 nmol.mg protein^{-1}.2 min^{-1}). In addition, sensitivity of the xylitol uptake by yeast expressing HbPLT2 and yeast expressing AgMAT2 to an excess of quebrachitol was measured. 0% means that there is no difference between the uptake of substrate between yeast transformed with *HbPLT2* and yeast transformed with the empty plasmid. Asterisks represent a statistically significant ($P<0.05$) difference, in comparison to control (% of xylitol uptake).

identity was found with *MdSOT5* (*Malus domestica* Sorbitol Transporter) and the lowest identity was observed with *PmPLT2* (*Plantago major* Polyol Transporter 2). HbPLTs display 70% identity with AtPLT5.

Functional expression of HbPLT2 in baker's yeast

Because of the high identity between HbPLT1 and HbPLT2 (89%), HbPLT2 was the only putative polyol transporter, whose functional activity was characterized in yeast strain. In order to check for the activity of HbPLT2 as a transporter, heterologous expression in yeast was conducted. Radioactive quebrachitol is not commercially available, so we initially tested the uptake of xylitol. Xylitol is taken up by all polyol transporters tested so far (Lemoine, unpublished data), and therefore it was an obvious choice for these experiments. Three yeast clones independently transformed with HbPLT2 showed significantly higher xylitol uptake than the yeast strain transformed with the empty plasmid (data not shown). In order to test the specifity of HbPLT2, a whole range of radiolabeled substrates were tested, both cyclic (myo-inositol) and acyclic (mannitol, sorbitol, glycerol) polyols, sucrose and hexoses (glucose and fructose, Table 1). Clearly, xylitol is the substrate that is transported at the highest level by HbPLT2: acyclic polyols are only marginally transported and none of the other substrates tested is transported above background. In parallel, to further confirm the specificity of HbPLT2, similar experiments were run on AgMaT1, the mannitol transporter from celery (Noiraud et al. 2001a). AgMaT1 behave differently from HbPLT2, being able to transport mannitol and xylitol (Table 1). Xylitol uptake by HbPLT2 seems to occur via a proton-coupled mechanism as it is inhibited by the protonophore CCCP in a similar way as AgMaT1 (Table 1).

If HbPLT2 is a quebrachitol transporter then it is expected that xylitol uptake is inhibited by an excess of quebrachitol. This is confirmed by the results in Table 1, where xylitol uptake is reduced by increasing concentration of quebrachitol. Interestingly, a 10 times excess of quebrachitol had no effect on xylitol uptake by AgMaT1, therefore suggesting that the effect of quebrachitol is limited to HbPLT2. Taken together, the different data suggest that HbPLT2 has a very restricted substrate specificity and that quebrachitol is a substrate for HbPLT2.

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

Ethylene effect on the expression pattern of *HbPLT1* and *HbPLT2* in the latex and bark of virgin trees

HbPLT1 transcripts were accumulated in latex within the first 4 h (3-fold), before returning to its basal level as soon as 8 h after ethylene treatment (Fig. 3A). An opposed pattern was observed for *HbPLT2*. Significant up-regulation of *HbPLT2* was observed from 8 h (3-fold), and reached its maximum (5-fold) at 40 h after treatment.

In bark tissue (Fig. 3B), ethylene treatment also resulted in a differential transcript accumulation of *HbPLT1* and *HbPLT2*. *HbPLT1* was early and transiently up-regulated. Its expression level was higher at 4 h (6-fold) and then decreased to its basal level after 40 h. *HbPLT2* was highly stimulated during the time course of ethylene treatment, when compared to control. The highest induction was found at 4 and 24 h (10-fold) and decreased to 4-fold at 40 h after treatment.

Effect of hormones and wounding on the pattern expression of *HbPLT1* and *HbPLT2* in the latex

Since the transcript level of *HbPLT1* and *HbPLT2* exhibited a differential response to ethylene treatment in virgin trees, their respective response to various hormonal and wounding treatments was compared. Globally, *HbPLT2* was more sensitive to these treatments than *HbPLT1* (Fig. 4A and B).

Except for abscisic acid, all of the other treatments applied to bark led, to varying degrees, to a transient accumulation of *HbPLT1* transcripts (Fig. 4A). The strongest level was found within the first 8 h for jasmonic acid (9-fold), salicylic acid (4-fold) and auxin (15-fold) and at 16 h for nails (8-fold). Transcript levels of *HbPLT2* were also affected by these treatments (Fig. 4B), and the strongest effect was observed under nail sealing treatment (mechanical wounding). Indeed, in comparison to control, it led to an early (within the first 4h) and progressive up-regulation of *HbPLT2* with a maximum reached after 16 h of treatment (16-fold).

***In situ* hybridization**

To give an insight into the spatial distribution of these polyol transporters, the *in situ* hybridization approach was used on young stems of cut-back hevea. To do this, experiments

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

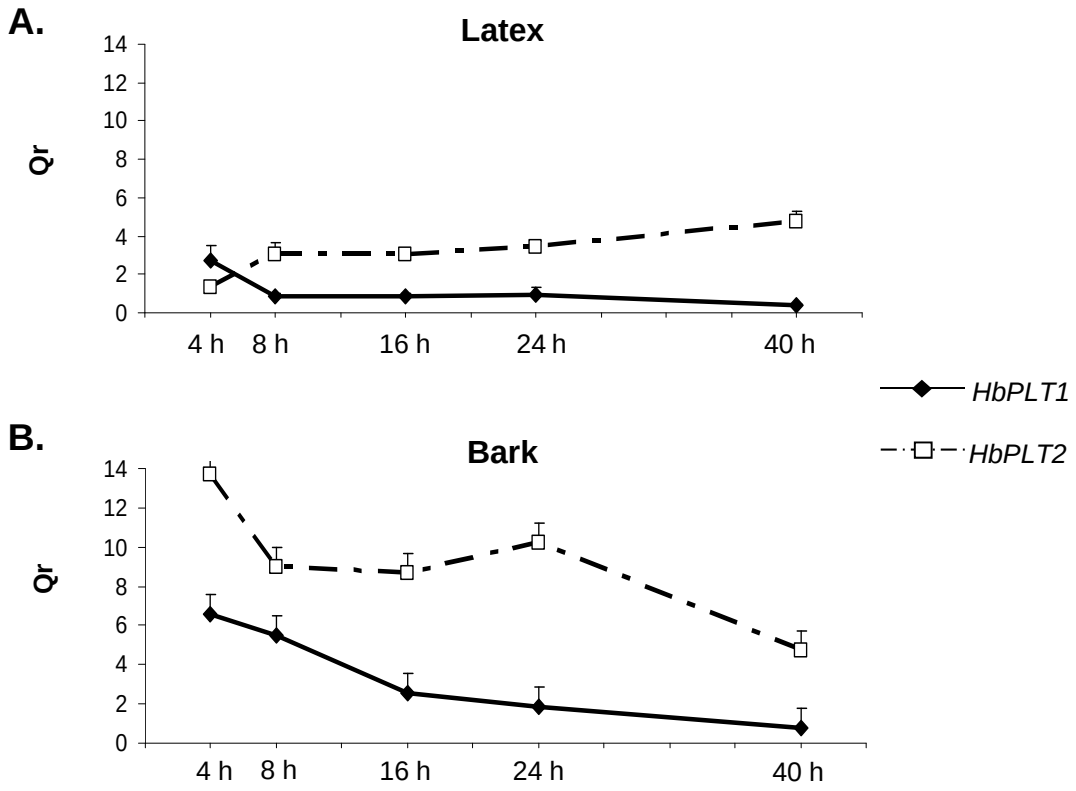


Figure 3: Transcript accumulation of HbPLT1 and HbPLT2 after ethylene stimulation in latex (A) and inner bark (B) of mature virgin(unexploited) trees.

mRNA was extracted from latex and inner bark of three virgin trees (PB217), and the relative transcript levels of *HbPLT1* and *HbPLT2 were determined using real-time PCR and normalized* using actin as the reference gene. Values are the mean of three replicates of a PCR and bars represent the technical standard deviation. Only statistically different results with $P < 0.01$ (Student's test) were considered.

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

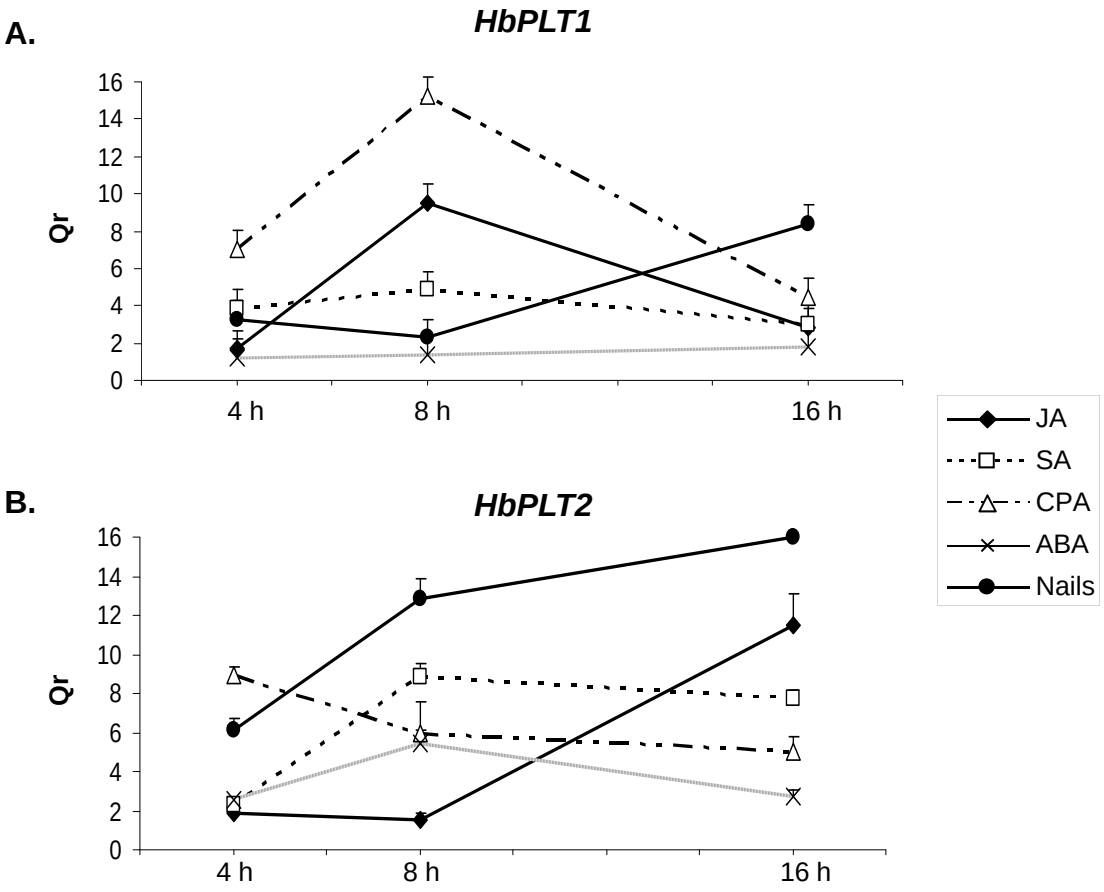


Figure 4: Transcript accumulation of HbPLT1 and HbPLT2 after hormonal treatment or wounding in latex of three mature virgin trees.

Relative transcript levels of *HbPLT1 (A) and HbPLT2 (B)* were monitored in latex of three virgin trees treated with jasmonic acid (JA), salicilyc acid (SA), 4-chlorophenoxyacetic acid (CPA; an auxin analog), ABA or nail planting. Relative transcript levels of *HbPLT1 and HbPLT2 were* determined using real-time PCR and normalized using actin as the reference gene. Values are the mean of three replicates of a PCR and bars represent the technical standard deviation. Only statistically different results with $P < 0.01$ (Student's test) were considered.

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

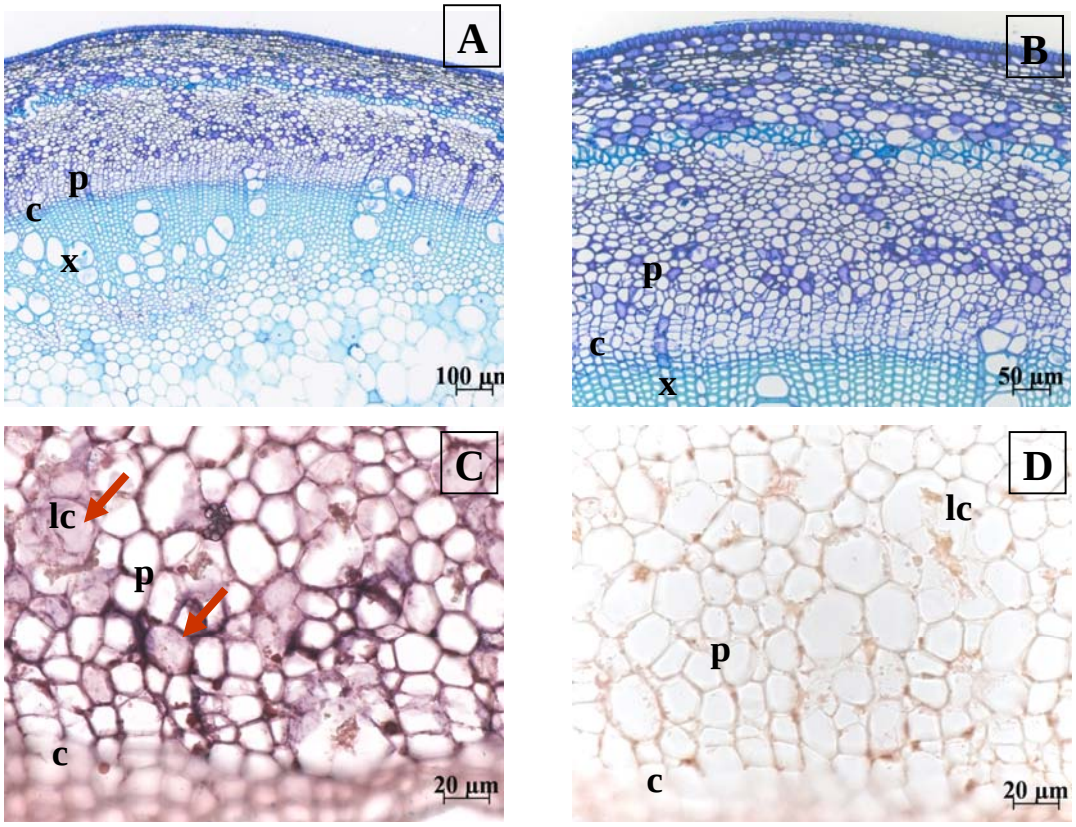


Figure 5: In situ localization of *HbPLT1* and *HbPLT2* transcripts in the stem of young virgin trees.

Transverse sections (12 µm thick) were obtained and hybridized with antisense © and sense (D) probes specific for *HbPLT1 and HbPLT2*. *Positive* hybridization signals are visualized by violet using a digoxigenin-labeled RNA immunodetection system. Sections (A, B) were stained with toluidine blue, to identify the cellular structures [sections A and B were presented previously in Dusotoit-Coucaud et al. (2009)]. P, phloem; C, cambium; lc, laticifers.

were carried out with a probe that recognizes both *HbPLT1* and *HbPLT2* (around 260 bp long).

No signal was detected with the sense probe (Fig. 5D,F and H), whereas a typical coloration was observed with the antisense probe (Fig. 5C, E and G). This coloration reflects the presence of *HbPLTs* (1 and 2) transcripts in young hevea stems (Fig. 5C and F), mainly in bark cells. In this latter, the coloration is confined in the cambial zone and in the phloem, where some putative laticifers are specifically colored (Fig. 5G). The recently differentiated cells of xylem depict a specific coloration as well (Fig. 5G).

Promoter cloning and *in silico* characterization

To provide the first clues about the molecular mechanism behind the *HbPLT2* regulation in response to different treatments, the promoter of *HbPLT2* (PrHbPLT2) was cloned and its putative *cis*-acting regulatory elements were *in silico* identified.

PrHbPLT2 corresponds to a polynucleotide sequence of 1140 pb long upstream from the start codon of HbPLT2, and harbored all motifs described as perquisite for accurate initiation of basal transcription in plants. A single CTATATATA sequence corresponding to the consensus sequence for TATA boxes in plants was found at 138bp before the ATG. Two CCAAT boxes, usually present in the 5'noncoding region of eukaryotic genes (Hanley and Schuler 1988) were identified in the distal region of PrHbPLT2.

Among the others putative cis-regulatory elements, one classical ethylene responsive element (ERELEE box; 5'-AWTTCAAA-3') was found at the right strand (-strand) in position -531 (Itzahki et al. 1994, Montgomery et al. 1993). In addition, this promoter includes three motifs described as dehydration/ABA responsive elements (Abe et al., 2003), including two CANNTG motifs located at -389 and -431 (- strand) and one CACATG motif located at -991 (+ strand). Number of repetitive wounding responsive element [three TGACT motifs in positions -48, -330 and -393 (+ strand) and one AGTCA motif in position -425 (- strand)] were also found. Two GNATATNC motifs described as phosphate starvation responsive element in genes of several plants (Rubio et al. 2001) were present in position – 645 and -945 of the *HbPLT2* promoter. All these above described boxes were mapped in figure 6.

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

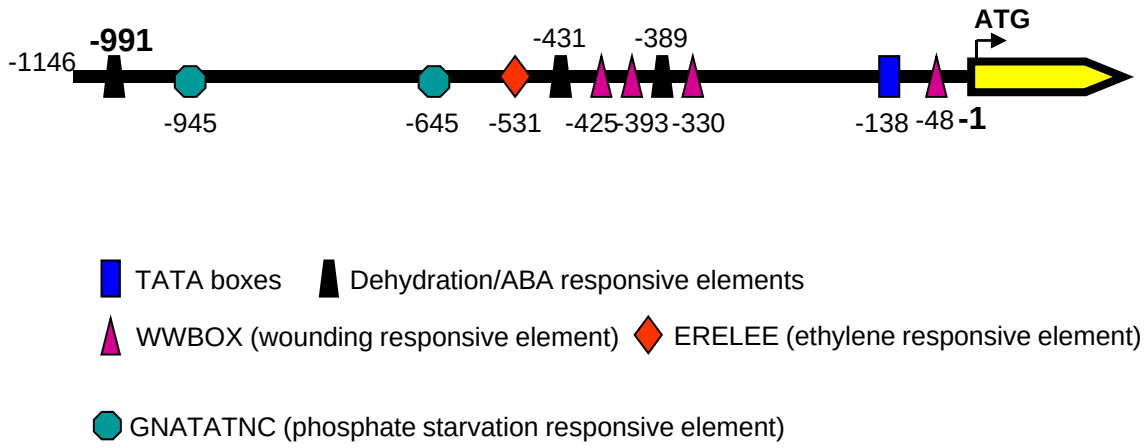


Figure 6: Map of the *HbPLT2* promoter.

The consensus sequences corresponding to various putative *cis* elements are described in the data section. Positions are numbered with respect to the first base of the translation start ATG.

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

DISCUSSION

Laticifers contain many plasma membrane transporters for sugar and sugar alcohols

The ethylene stimulation of the latex yield means that laticifers become metabolically active structures that demonstrate a sizeable demand for assimilates. By screening a latex-cDNA library, seven sucrose transporter isoforms (Dusotoit-Coucaud et al. 2009b), 1 putative hexose transporter (Accession number FM244737; Dusotoit-Coucaud, Chrestin and Sakr, unpublished data) and 2 polyol transporters (*HbPLT1* and *HbPLT2*, Figure 1) were isolated. The presence *in planta* of sucrose and polyol transporter transcripts was confirmed by *in situ* hydridization data (Dusotoit-coucaud et al. 2009b; Fig. 5). This wide diversity of plasma membrane transporters is a peculiar feature of laticifers and fits in with those ultrastructural (Hébant 1981, de Faÿ and Jacob 1989) and physiological (Bouteau et al. 1991, 1992, 1999) findings that show that these cells are apoplastically isolated from neighboring cells of the soft bark. The large number of sucrose transporter isoforms might reflect the relative significance of sucrose *versus* polyol and hexose transporters in laticifer metabolism, and underlines a complex mechanism by which these highly specialized cells tailor sugar importation to meet their metabolic function. The coexistence of sucrose and polyol transporters in the same cells has only been described in a small number of cases. In common plantain (*Plantago major*), two polyols transporters (PmPLT1 and PmPLT2) and a sucrose transporter (PmSUC2) were co-immunolocalized in the companion cells, where together they participated in the loading of photosynthesis-derived sorbitol and sucrose in phloem (Ramsperger-Gleixner et al. 2004). The coexistence of a sucrose transporter (MdSUT1) and sorbitol transporter (MdSOT1) was also reported in parenchyma cells of apple fruits (Fan et al. 2009). A similar conclusion was proposed for the celery mannitol (AgMAT1) and sucrose (AgSUT1) transporters (Noiraud et al. 2000, 2001a) in mature leaves.

HbPLTs are new polyol transporters

HbPLT1 and *HbPLT2* showed 89% identity at the protein level (Fig. 1) and were closely related to the previously cloned acyclic polyol transporters (Fig. 2). The closest identity (77%) was shared with *MdSOT5* (*Malus domestica* Sorbitol Transporter). Unexpectedly, HbPLTs were markedly distinct from transporters of cyclic polyol, such as AtINTs (*Arabidopsis thaliana* Inositol transporters, Schneider et al. 2006 and 2007) and Mitrs [*Mesembryanthenum crystallinum* Inositol Transporters (Chauhan et al. 2000)]. These findings could mean that

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

HbPLTs are not members of the acyclic polyol transporter family, even though quebrachitol is a cyclic polyol. This is consistent with the functional activity of *HbPLT2* in the yeast strain, clearly showing that HbPLT2 is a new polyol transporter. In fact, HbPLT2 did not drive any active uptake of sucrose, hexoses (glucose and fructose), xylose or glycerol (Table 1). Marginal absorption was only found for sugar polyols including cyclic (inositol), and acyclic ones (sorbitol and mannitol). By contrast, xylitol, an acyclic polyol, was highly absorbed by HbPLT2 (Table 1). This fits in with previous works describing competition between xylitol, sorbitol (Watari et al. 2004) and mannitol (Juchaux-Cachau et al. 2007) uptake and with the fact that xylitol is taken up by the majority of acyclic polyol transporters identified so far (Lemoine, unpublished data). To validate its capacity to take up quebrachitol, competition experiments were carried out for both HbPLT2 and AgMAT1, one of the most characterized acyclic polyol transporters (Noiraud et al. 2001a). Quebrachitol significantly reduced xylitol absorption by HbPLT2 in a concentration-dependent manner, whereas no effect was found with AgMAT2. Likewise, AgMAT1, HbPLT2-mediated xylitol absorption was inhibited by CCCP, providing further evidence that HbPLT2 functions as a plasma membrane-energy dependent, H^+/quebrachitol symporter.

On the other hand, the isolation of two isoforms of *HbPLT*s from laticifer-derived cDNA points to the existence of a multigenic family, as in the case of other polyol transporters. For example, two cDNA for sorbitol transporters were identified from sour cherry (*PcSOT1* and *2*, Gao et al. 2003), common plantain (*PmPLT1* and *2*, Ramsperger-Gleixner et al. 2004), and 3 others from apple (*MdSOT3,4* and *5)* (Watari et al. 2004). Two cDNA encoding mannitol transporters were isolated and characterized from phloem celery (Noiraud et al., 2001, Juchaux-Cachau et al. 2007).

HbPLT2 can contribute to the turgor status of inner bark cells

Much evidence in the literature indicates that an increase in transcript levels of sugar transporters is often associated with a high activity of the corresponding proteins, suggesting a major transcriptional regulation of these proteins (Chiou and Bush 1998, Decourteix *et al*. 2006, 2008, Gao et al. 2003, Pommerrenig et al. 2007). The expression profile of *HbPLT2* following ethylene treatment, can be associated with the turgor status of inner bark cells, including laticifers. Compared to *HbPLT1*, *HbPLT2* transcripts were rapidly (within 4h) and substantially (up to 14-fold) up-regulated over the studied time course (Fig. 3B). Similar patterns, albeit to a lesser extent, were reported for *HbPIP2* aquaporin, that was described as

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

being involved in water conductance of inner bark cells and thereby in the modulation of their turgor status (Tungngoen et al. 2009). Within this context, HbPLT2 could generate the osmotic force, by promoting a quebrachitol accumulation in cells of the inner bark. This situation could lead to water flow from xylem to inner bark tissue *via* HbPIP2 (Tungngeon et al., 2009). This physiological role of HbPLT2 can be extended to laticifers, for which a significant up-regulation of *HbPLT2* transcripts was also observed (Fig. 3A). *HbPLT2* up-regulation started within the first 8h, attaining a plateau at the end of the time course (40h, 5-fold). *HbPLT2* expression was paralleled to the ethylene stimulation of both aquaporin transcripts (*HbPIP2,1* and *HbTIP1*,1) and latex dilution (Tungngoen et al., 2009), and commenced prior to ethylene induction of transcripts for two putative sucrose transporters (*HbSUT1A* and *HbSUT2A*, Dusotoit-Coucaud et al. 2009b). Indeed, up-regulation of *HbSUT1A* and *HbSUT2A* started later (16h after ethylene treatment), and was thought to be correlated with the high sucrose provision of the laticifers that was required for the ethylene stimulation of rubber synthesis (Dusotoit-Coucaud et al. 2009b). However, the hypothesis suggesting that part of this absorbed sucrose contributes to a generation of ethylene-induced high turgor pressure of laticifers cannot be ruled out (Buttery and Boatman 1966). Interestingly, such a scenario cannot be applied to inner bark cells, in which no ethylene stimulation of *HbSUT*s transcripts was found (Dusotoit-coucaud et al. 2009b). Collectively, we can infer that the previously described ethylene effect on latex dilution (Baptist and de Jonge 1955, Tjasadihardja and Kardjono 1974, Coupé and Chrestin 1989) appears to be related to a concomitant regulation of *HbPLT2* and aquaporins (*HbPIP2,1*; *HbTIP1;1)* in both inner bark cells and laticifers. This possibility was borne out by the i*n silico* characterization of their respective promoters (Fig. 6, Tungngoen et al. 2009). Pr*HbPLT2* and Pr*HbTIP1;1* contained the most common ethylene responsive element (ERELEE4 box) in the proximal region (-531 and -241 bp upstream of the start codon, respectively), that has been described as an ethylene responsive enhancer element of a carnation gluthatione-S-transferase gene involved in senescence (Izahki et al. 1994) and of the E4 gene expressed during tomato ripening (Montgomery et al. 1993). Its presence was also reported for the promoter of *VvHT1* (*Vitis vinifera* Hexose Transporter 1; Fillion et al., 1999) and other sucrose transporters such as AtSUC3 (Delrot et al., 2001). The promoter of HbPIP2;1 contains one GCC box at the proximal position (Tungngoen et al. 2009), that was identified in the *Solanum melongena* gene encoding cysteine proteinase (Rawat et al. 2005). An important future task well be to determine the molecular mechanism network behind this ethylene-mediated concomitant

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

regulation of quebrachitol accumulation (HbPLT2) and water transport (HbPIP2;1 and HbTIP1;1).

HbPLT2 expression was not specifically sensitive to ethylene

HbPLT2 expression was also sensitive to mechanical wounding (Fig. 4B). Such a response was less marked for *HbPLT1* (Fig. 4A) and was not found for *HbSUT1A* and *HbSUT2A* (Dusotoit-Coucaud et al. 2009b). Among the previously characterized plasma membrane sugar transporters, only one hexose transporter (*AtSTP4*, Truernit et al. 1996), one sucrose transporter (*ATSUC3*, Meyer et al. 2004) and one polyol transporter (*AtPLT5*, Reinders et al. 2005) were reported to be stimulated by wounding. These findings were interpreted as a stimulation of carbohydrate importation into adjacent cells of the lesion site or as a mechanism for the efficient reduction in availability of extracellular nutrients, which prevents the growth of potential pathogens. One important feature of PrHbPLT2 was the presence of many cis regulatory elements related to dehydration/ABA responses which underlie the antioxidative and osmoprotectant proprieties of polyols in plant physiology. It has been shown that mannitol enhances resistance to salt stress (Tarczynski et al. 1993), acts as an antioxidant (Shen et al. 1997a, b) and performs a function in plant-pathogen interactions (Jennings et al. 1998, Juchaux-Cachau et al. 2007). The role of two plantago polyol transporters (PmPLT1 and PmPLT2) in salt-tolerance was recently demonstrated (Pommerrenig et al. 2007). Like this aliphatic polyol transporter, cyclic polyol transporters also assume a central role in physiological adaptations to different stress stimuli. Eucalyptus tolerance to drought (Merchant et al. 2006, Arndt et al. 2008) and salt stress (Adams et al. 2005) could be correlated with an accumulation of quercitol. Myoinositol transporter can participate in the maize root response to drought stress (Spollen et al. 2008). Although the physiological significance of the different boxes identified in PrHBPLT2 should be determined by reporter gene experiments, their presence lays open the possibility of investigating other roles of HbPLT2 in the physiology of hevea trees.

In conclusion, we identified a new polyol transporter, *HbPLTs*, in *Hevea brasiliensis*, an important industrial crop for natural rubber production. Its functional characterization in the yeast strain lends support to the idea that it acts as a plasma membrane-energy dependent H^+/quebrachitol symporter. Based on our findings and those previously obtained on sucrose transporters (Dusotoit-Coucaud et al. 2009b) and aquaporins (Tungngoen et al. 2009), we hypothesize, as shown in Figure 7, that ethylene stimulation of latex yield in virgin trees

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

might globally result from a coordinated regulation of two yield intrinsic-limiting factors. The first is latex dilution that determines the duration of latex outflow (d'Auzac et al. 1989a). This process may depend on the concomitant up-regulation of a quebrachitol transporter (*HbPLT2*) and two aquaporins (*HbPIP2,1* and *HbTIP1*). The second is rubber synthesis, *via* a stimulation of two putative sucrose transporters (*HBSUT1A* and *HBSUT2A*). The contribution of sucrose to the generation of laticifer turgor pressure cannot be excluded. An important future task will therefore be to identify the mechanism that determines these responses to ethylene, which should reveal the means of boosting latex yield. In addition, this work lays open the possibility of investigations into other quebrachitol functions in relation to the physiological features of *Hevea barasiliensis*.

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

MATERIALS & METHODS

Plant Material

The latex and bark samples for RNA extraction were collected after diverse treatments, from virgin rubber trees of the PB217 clone. These trees were selected for their medium homogeneous growth and yield at the Bango/SAPH plantation (Côte d'Ivoire). Here, mature virgin trees were never tapped or stimulated.

Field experiments: ethylene, hormonal and wounding treatments (Bongo/SAPH)

To characterize the ethylene effect on transcript level of quebrachitol transporters (*HbPLT1* and *HbPLT2*), chronostimulation experiments were designed. Seven batches of three virgin trees were set up as follow: two as a control (unstimulated), and five others were treated for 4, 8, 16, 24 and 40 hours with 5% Ethrel® (Kongsawadworakul et al. 2004; Dusotoit-Coucaud et al. 2009b). The latex and bark samples were collected as described by Dusotoit-Coucaud et al. (2009b). A similar protocol was used to analyse hormones and wounding effects on expression patterns of the same polyol transporters. Briefly, five batches of three mature virgin trees were set up, one as a control (untreated), and four others were treated with 2.5% jasmonic acid (JA), 625µM salicylic acid (SA), 1% 4-chlorophenoxyacetic acid (CPA, auxin analog), 2.5% abscisic acid (ABA) or nails (N), for 4, 8 and 16 hours before the tapping.

Molecular cloning of polyol transporter full-length cDNA

Two latex and bark polyol transporter probes were obtained by polymerase chain reaction (PCR) directly carried out on latex or bark libraries. To do this, two degenerate primer

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

couples were designed from conserved regions of plant polyol transporter cDNAs (EMBL data library). These primers are [primer PLT_F1 (5'- ATGCC**N**GA**R**TC**N**CC**H**CG**B**TGGCT -3'), and primer PLT_R1 (5'- A**Y**CTC**N**GA**R**CT**R**TA**NM**CCCA -3')], and [primer PLT_F2 (5'- T**B**A**YR**AT**H**GC**N**CC**N**GT**B**TA -3'), and the same primer PLT_R1].

Amplifications were carried out in a thermal cycler (PTC-200; MJ Research, Watertown, MA, USA) using standard protocols. The different amplified fragments were sequenced and then used as PLT homologous probes to screen the latex cDNA library (Dusotoit-Coucaud et al. 2009b) under low stringency conditions. Five clones were obtained and completely sequenced. DNA sequence information showed that they corresponded to two full length cDNAs, which were referred to as *HbPLT1* and *HbPLT2*. Their respective sequences have the following EMBL/GenBank/DDBJ accession numbers: AM924132 and AM924133.

Phylogenetic tree

Confirmed or predicted plant polyol transporter sequences from publicly accessible databases (EMBL/GenBank/DDBJ) were used to construct a phylogenetic tree. Protein sequences were aligned using **MU**ltiple **S**equence **C**omparison by **L**og-**E**xpectation (http://www.ebi.ac.uk/Tools/muscle/) and the tree was calculated using the PhyML program (http://www.phylogeny.fr/version2_cgi/one_task.cgi?task_type=phyml) and Treeview.

Accession numbers of presented sucrose transporter sequences are: AaMAT (*Artemisia annua*, EU564818), AgMAT1 (*Apium graveolens*, AAG43998), AgMAT2 (*Apium g.*, AAL85876), AgMAT3 (*Apium g.*, ABX71752), AhMAT2 (*Arachis hyposaea*, EU596482), AtMATp (*Arabidopsis thaliana*, NP179209), AtPLT5 (*Arabidopsis t.*, NM112769), CcSTP1 (*Coffea canephora*, ABK29439), CsMAT2 (*Citrus cinensis*, EU579526), GhMAT2 (*Gossypium hirsutum*, ACC61047), GmSorT (*Glycine max*, CAD91337), HbPLT1 (*Hevea brasiliensis*, AM924132), HbPLT2 (*Hevea b.*, AM924133), LjPLT4 (*Lotus japanicum*, CAJ29291), MdSOT1 (*Malus x domestica*, BAD42344), MdSOT2 (*Malus x d.*, AY237401), MdSOT3 (*Malus x d.*, AB125646), MdSOT4 (*Malus x d.*, AB125647), MdSPT5 (*Malus x d.*, AB125648), OeMAT1 (*Olea europaea*, AAY88181), OrMAT2 (*Orobanche ramose*, AAN07021), PcSorT1 (*Prunus cerasus*, AF482011), PcSorT2 (*Prunus c.*, AY100638), PmPLT1 (*Plantago major*, CAD58709), and PmPLT2 (*Plantago major*, CAD58710).

Functional expression in yeast

The *HbPLT2* cDNA was cloned into the XhoI and SmaI sites of the yeast expression plasmid pDR196. The plasmid was used to transform yeast strain RS453 as described in Noiraud et al. (2001a). Yeast cells were grown overnight on minimal liquid medium (YNB, Noiraud et al.,

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

2001a) to an OD (optic density) of 0.6. Cells were collected, rinsed once and resuspended in 20 mM MES buffer at pH 5.0 to the initial OD.

Uptake experiments were run as described in Noiraud et al. (2001a). Briefly, 100 µl of yeast cells were mixed with an equal volume of buffer containing the radioactive substrate. After 2 min incubation at 30°C, yeast cells were collected by vacuum filtration on a glass fiber filter. The amount of radioactive substrate taken up was determined by liquid scintillation counting. The results are expressed on a protein basis (Noiraud et al., 2001a). Quebrachitol was purchased from Sigma.

RNA extraction

Total RNA extraction from latex was performed according to the method adapted from Pujade-Renaud et al. (1994, 1997) and developed by Sookmark et al. (2002). Total inner bark RNA extraction from mature trees was performed using the cesium chloride cushion method, adapted from Sambrook et al. (1989), with approximately 2 g of inner bark ground in liquid nitrogen.

Specific primers and Quantification of Polyol Transporters by Real-Time RT-PCR

To carry out real time RT-PCR, the following primer couples were designed for each isoform: *HbPLT1* [primer PLTF (5'-TGGGCTATTGCACTGTGCAT-3') and primer PLT1R (5'-CCCAACTACAACCTTCAAAGGG-3')], *HbPLT2* [primer PLTF and primer PLT2R (5'-GTTCTAAGCACCACACGTTACA-3')]. Their specificity was tested by carrying out semi-quantitative and real-time RT-PCR on each full-length cDNA cloned in pGEM-T easy vector (Promega, Madison, WI, USA). Real-time RT-PCR reactions were performed as described in Dusotoit-Coucaud et al. (2009b). Briefly, RNA samples were firstly treated with DNase I, and 2 µg of total RNA was used as template in the reaction of first strand cDNA synthesis according to the manufacturer's instructions (SuperScript-III, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Real-time PCR was performed using the generated cDNA as template, a fluorescent dye SYBR-Green and an iCycler system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). ΔCt was calculated from the formula: $\Delta Ct = Ct_{(treated\ sample)} - Ct_{(control\ sample)}$. The normalized expression ratio (Qr) could be calculated using the comparative Ct method, with the formula: $Qr = E^{-\Delta\Delta Ct}$ (E = efficiency of the primer couple, ΔΔCt = ΔCt sucrose transporter - ΔCt actin).

In situ hybridization

Tissue preparation was carried out according to the method of Brunel et al. 2002. Briefly, 12-µm-thick transversal sections were dried at 42°C for two days and paraffin was removed by

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

two baths (10 min each) of Histoclear II. After a rehydration step in ethanol, slides were treated with proteinase K at 10 µg.ml^{-1} in PBS 1X at 37°C for 15 min and then incubated in glycine at 0.2% in PBS 1X at room temperature for 2 min. Slides were then fixed in 4% paraformaldehyde (in PBS 1X) for 10 min, rinsed in PBS 1X and then acetylated using 0.5% acetic anhydride in 0.1 M triethanolamine for 10 min and rinsed in PBS 1X. Sections were hybridized with equal concentrations (1.5 ng.µl^{-1}) of either sens or antisens probes and incubated at 50°C overnight in a humid chamber. Sens and antisens probes were synthesized as described earlier (Brunel et al. 2002). Sections were then washed and the detection of DIG-labelled probes was performed as reported by Poupard et al. (2001) using an anti-digoxigenin alkaline phosphatase conjugate.

Promoter cloning and sequence analysis

The cloning of *HbPLT2* promoter was made by using the GenomeWalker Universal kit (Clonthech, Mountain View, USA) and following the manufacturer's instructions. A sequence of 1140bp long was cloned and *in silico* analysed with the website PLACE (http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/signalscan.htm1).

Funding

This work was supported by the Manufacture Française des Pneumatiques MICHELIN.

Acknowledgements

We are grateful to the staff of the SIPH Headquarters and of the Bongo Rubber Plantation in Côte d'Ivoire (West Africa) for their logistical and technical help in field experiments, as well as for allowing access to all their plant materials and laboratory facilities.

REFERENCES

Dans un souci d'allègement la liste bibliographique est intégrée à la Bibliographie finale du manuscrit de thèse (p128).

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

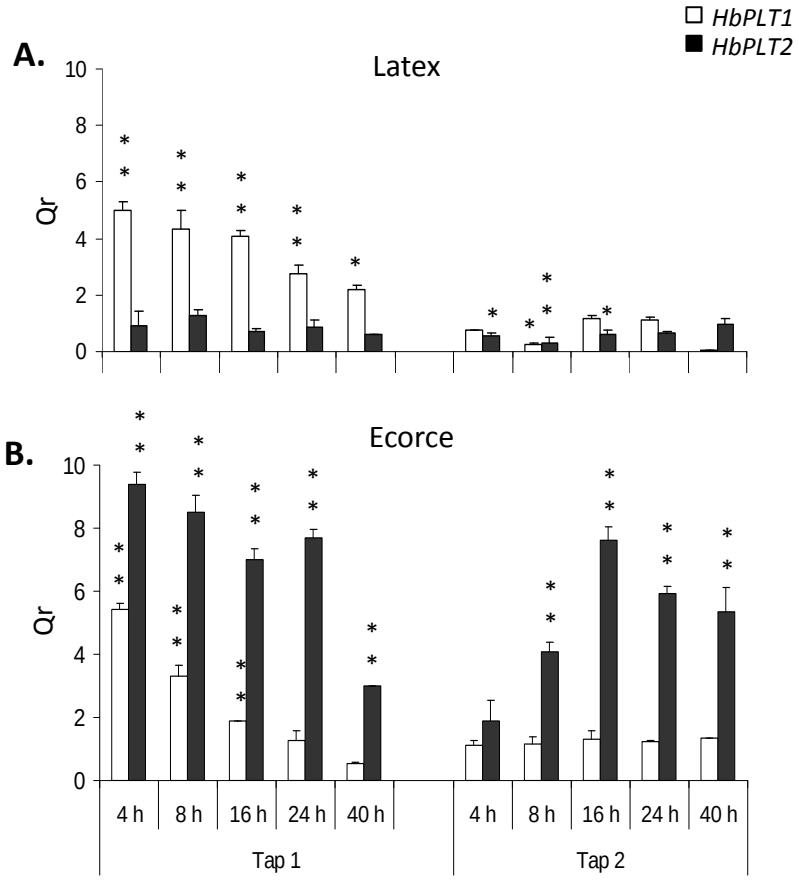


Figure 32 : Accumulation des transcrits de transporteurs de polyols après stimulation à l' Ethrel® d'arbres exploités du clone PB217.

Les niveaux de transcription des transporteurs de polyols *HbPLT1* et *HbPLT2* ont été suivis après stimulation à l'Ethrel® dans le latex (A) et l'écorce de PB217. Les échantillons d'ARNm d'arbres matures exploités ont été utilisés pour des analyses par RT-PCR en temps réel. Les échantillons ont été prélevés 4 h, 8 h, 16 h, 24 h et 40 h après le traitement (Tap1) et après trois jours de repos (Tap2). Le Qr a été calculé par la méthode $E^{-\Delta\Delta Ct}$ avec les échantillons non-traités pour références et l'actine pour gène de ménage. Les barres représentent l'erreur standard technique. Les résultats ont été statistiquement analysés avec le test de Student : * indique P <0,05 et ** P <0,01.

Résultats complémentaires

1. Expression de *HbPLT1* et *HbPLT2* chez les arbres exploités du clone PB217

L'étude de l'expression de ces transporteurs putatifs de polyols a également été menée chez des arbres exploités du clone PB217. Comme pour les transporteurs de sucres, nous avons analysé l'expression de ces transporteurs dans le latex et l'écorce d'arbres exploités en réponse à un traitement éthylénique, conjointement sur PB217 et PB260 aux métabolismes contrastés. Cette étude comparative sur deux génotypes différents a pour objectif de valider le rôle de ces transporteurs dans le fonctionnement des cellules laticifères et d'estimer leur implication dans la production de latex chez l'hévea.
Ces études ont été réalisées sur les mêmes ARNm de latex et d'écorce, que ceux utilisés pour la caractérisation de l'expression des transporteurs de saccharose chez les arbres exploités des clones PB217 et PB260.

Chez les arbres exploités du clone PB217, la régulation de la quantité de transcrits des transporteurs de polyols *HbPLT1* et *HbPLT2* sont très contrastées, comme le montre la figure 32. Dans le latex, seule l'expression de *HbPLT1* est stimulée d'un facteur 4 par l'éthylène en début de Tap1. Aucune stimulation n'a pu être détéctée en Tap2. Dans l'écorce, l'accumulation de transcrits de *HbPLT1* est augmentée par l'éthylène dès 4 h (5 fois) avant de retrouver son niveau basal à 16 h en Tap1. L'expression de *HbPLT2* est globalement très stimulée (6 à 10 fois) par l'éthylène en Tap1 et 2 dans l'écorce.

2. Expression de *HbPLT1* et *HbPLT2* chez les arbres exploités du clone PB260 :

Les résultats présentés dans la figure 33 mettent en évidence une régulation différente pour les deux isoformes de *HbPLTs* chez le clone PB260. Dans le latex, l'expression de *HbPLT2* est faiblement et transitoirement induite par l'éthylène, avec une augmentation maximale de 2,5 fois après 8 h de traitement lors de la saignée 1 (Tap 1). Aucune stimulation n'a été observée durant la saignée 2 (Tap 2), laquelle est caractérisée par une augmentation précoce (4 h) et transitoire (3,5 fois) de l'expression *HbPLT1* (figure 33 A). Dans l'écorce, l'expression de *HbPLT1* est légèrement augmentée par application de l'éthylène en Tap1 et à

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

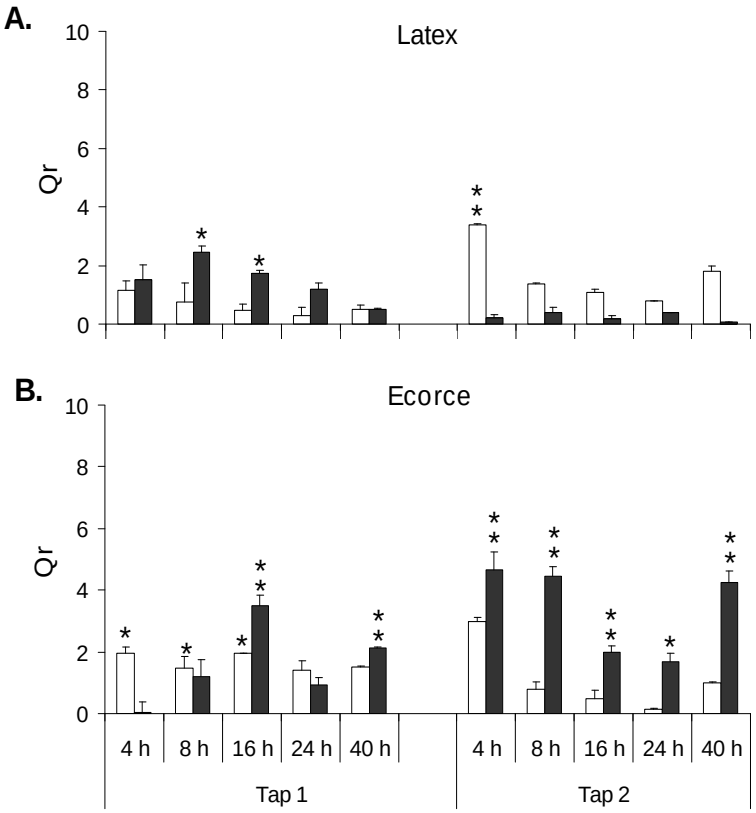


Figure 32 : Accumulation des transcrits de transporteurs de polyols après stimulation à l' Ethrel® d'arbres exploités du clone PB260.

Les niveaux de transcription des transporteurs de polyols *HbPLT1* et *HbPLT2* ont été suivis après stimulation à l'Ethrel® dans le latex (A) et l'écorce de PB260. Les échantillons d'ARNm d'arbres matures exploités ont été utilisés pour des analyses par RT-PCR en temps réel. Les échantillons ont été prélevés 4 h, 8 h, 16 h, 24 h et 40 h après le traitement (Tap1) et après trois jours de repos (Tap2). Le Qr a été calculé par la méthode $E^{-\Delta\Delta Ct}$ avec les échantillons non-traités pour références et l'actine pour gène de ménage. Les barres représentent l'erreur standard technique. Les résultats ont été statistiquement analysés avec le test de Student : * indique P <0,05 et ** P <0,01.

4 h après traitement en Tap2 avant de retourner à son niveau basal ; tandis que la quantité de transcrits de *HbPLT2* est transitoirement induite à 16 h en Tap1, et cycliquement induite à 4 h, 8 h et 16 h en Tap2.

Par conséquent ces transporteurs ont des profils d'expression différents dans le latex et dans l'écorce des arbres exploités du clone PB217 (Figure 32) et du clone PB260 (Figure 33). Sur la base de ces résultats comparatifs, et contrairement à *HbSUT1B* et à *HbHXT1*, la différence majeure entre les deux clones, en ce qui concerne l'expression des *HbPLTs* chez les arbres exploités, se situe plutôt dans l'écorce que dans les cellules laticifères.

3. Comparaison des promoteurs de *HbPLT1* et *HbPLT2* chez PB217 et PB260 :

Afin d'obtenir les premières informations sur les mécanismes moléculaires de la régulation de ces deux transporteurs de polyols, nous avons cloné leurs promoteurs chez les deux clones PB217 et PB260 (annexe 2).

A l'instar des transporteurs de saccharose, les promoteurs de *HbPLT1* chez PB217 et PB260 sont strictement identiques ; alors que ceux de *HbPLT2* présentent environ 94% d'identité. Si l'on compare les promoteurs des deux isoformes du même clone, seules les 235 premières paires de bases (de -1 à -235) présentent une identité de l'ordre de 80%, et partagent les mêmes éléments *cis* putatifs de régulation. Selon leur fonction putative, ces éléments cis ont été classés en trois groupes (tableau II).

- les boîtes ERELEE4 (Ethylen Responsive Element *Lycopersicon esculentum* E4 gene), correspondant aux éléments cis de régulation par l'éthylène. La boîte de ERELEE a été décrite comme un « ethylene-enhancer element » du gène codant la glutathion-S-transférase impliquée dans la sénescence chez l'œillet (Itzahki *et al*., 1994) et du gène E4 exprimé lors de la maturation des fruits chez la tomate (Montgomery *et al*., 1993). Les éléments ERELEE4 sont souvent retrouvés dans les promoteurs des transporteurs de sucres comme *VvHT1* (*Vitis vinifera* Hexose Transporter 1), *AtSTP3*, *AtSTP4* (*Arabidopsis thaliana* Sugar Transporter 3 et 4), *ATSUC1* et *AtSUC2* (*Arabidopsis thaliana* Sucrose Carrier 1 et 2) (Delrot *et al.*, 2000).
- les WBbox ou WRKYbox qui sont liés aux protéines WRKY (Ülker et Somssich, 2004 ; Eulgem *et al.*, 2007). Ces éléments *cis* peuvent avoir deux fonctions, soit ils activent les facteurs de transcriptions de type WRKY, soit ils sont activés par ces facteurs de transcription. Les protéines WRKY constituent une large famille de facteurs de transcription spécifiques des plantes et même si leur fonction reste aujourd'hui mal caractérisée, les

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

Cis-element	Facteur de Transcription associé	Nombre de copies	Fonction attendue	Référence
ERELEEL4		3	Régulation par l'éthylène	Itzhaki, 1994
WboxNTERF3	Protéines WRKY	3	Activation de ERF3 par la blessure	Nischiuchi, 2004
WKKY71OS	Protéines WRKY	4	Transduction Gibbérellines et mécanismes de défense	Zhang, 2004 Eulgem, 1999
WBboxPCWRKY1	Protéines WRKY	2		Eulgem, 1999
WBboxATNPR1		2	Régulation des protéines WRKY par l'AS	Yu, 2001
E-box	Protéines bZIP et bHLH	10	Régulation par la lumière et l'ABA	Hartmann, 2005
GATAbox	ASF-2	15	Régulation par la lumière	Reyes, 2004
GT-1	GT1 like factor	8	Régulation par la lumière et l'AS	Zhou, 1999
Ibox		7	Régulation par la lumière	Terzaghi, 1995
ARR1AT	ARR1	16	Activateur de transcription	Sakai, 2000
DOFCOREZM	Protéines DOF (1 doigt Zn)	14	Transcription gène du métabolisme C	Yanagisawa, 1999 ; 2000
MYB/MYC	Protéines MYB et MYC	20	Réponse à la déshydratation (ABA)	Abe, 2003 ; Lee, 2005
POLASIG		23	Signal de polyadénilation	Joshi, 1987
POLLEN1LELAT52		7	Expression spécifique dans le pollen (tomate)	Filichkin, 2004
NODCON2GM	noduline	6	Régulation par la noduline	Stougaard, 1990
OSE2ROOTNODULE		6	Activation dans les nodules racinaires	Fehlberg, 2005

Tableau II : Analyse *in silico* des séquences promotrices des gènes *HbPLT1* et *HbPLT2*.

Dans ce tableau sont regroupés les principaux éléments *cis* de régulation identifiés dans les séquences promotrices clonées des gènes *HbPLT1* et *HbPLT2*. L'analyse a été réalisée à l'aide de la base de données PLACE (http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/signalscan.html).

premiers éléments semblent indiquer qu'ils auraient un rôle majeur dans les mécanismes de défense face aux stress biotiques et abiotiques (Eulgem *et al.*, 2007).

- les E-Box, GATA box, GT-1, Ibox, qui sont impliqués dans les mécanismes de régulation par la lumière et certaines hormones telle que l'ABA. Les boîtes E-box et Ibox, ont déjà été décrites dans des promoteurs de transporteurs de sucres (Delrot *et al.*, 2000).

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

Ce dernier volet du travail a permis la mise en évidence de deux transporteurs putatifs de polyols dans les cellules laticifères *HbPLT1* et *HbPLT2*, qui appartiennent à la famille des MFS et possèdent 12 segments transmembranaires prédits. Leurs profils d'expression en réponse à l'éthylène, à d'autres hormones et à la blessure, dans le latex et l'écorce d'arbres vierges du clone PB217 ont été analysés. Les deux isoformes semblent être régulées différemment par l'éthylène et cette réponse dépend du tissu étudié. Comparativement à *HbPLT1*, l'expression de *HbPLT2* est fortement stimulée par l'éthylène, notamment dans les cellules de l'écorce, suggérant un rôle important de cette isoforme dans la modulation de la distribution de carbone entre les cellules de l'écorce et les cellules laticifères. D'autre part, les résultats obtenus sur les arbres exploités du clone PB217 supportent cette hypothèse car contrairement à *HbSUT1B* et à *HbHXT1*, les transcrits de *HbPLT2* s'accumulent préférentiellement dans l'écorce. Cette situation aboutirait à un détournement de carbone au détriment des cellules laticifères, ce qui est incompatible avec un rôle de *HbPLT2* dans l'importation de carbone nécessaire à la forte demande métabolique de ces cellules après traitement à l'éthylène. Bien que la fonction exacte de ce transporteur reste à déterminer, nous pouvons conclure que *HbPLT2*, *HbSUT1B* et *HbHXT1* ont des rôles différents dans la production de latex.

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

CONCLUSIONS

Dans ce chapitre, nous avons présenté l'étude des transporteurs de polyols des cellules laticifères d'*Hevea brasiliensis.* Les principaux résultats sont :

- Deux transporteurs putatifs de polyols ont été clonés dans les cellules laticifères d'hévéa : *HbPLT1* et *HbPLT2*.
- HbPLT1 et HbPLT2 seraient de nouveaux transporteurs de polyols. HbPLT2 est un transporteur fonctionnel spécifique du quebrachitol.
- Les deux transporteurs *HbPLT1* et *HbPLT2* sont co-exprimés dans les cellules laticifères et l'écorce.
- Les ARNm et les protéines de *HbPLT2* sont co-localisés au niveau des cellules laticifères et du xylème.
- Contrairement à *HbSUT1B* et à *HbHXT1*, *HbPLT2* n'aurait pas un rôle direct dans l'importation du carbone, mais serait primordial pour le maintien de la pression osmotique des cellules de l'écorce.
- *HbPLT2* ne semble pas être régulé spécifiquement par l'éthylène mais par les stress en général.

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

Discussion générale & Perspectives

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

L'objectif principal de ce travail était de comprendre le rôle des transporteurs de sucres et de polyols dans les cellules laticifères de l'hévéa, en relation avec la production de latex. Deux paramètres essentiels limitent cette production : la régénération et l'écoulement du latex (Lacrotte, 1991). Ces deux paramètres sont interdépendants : plus l'écoulement est aisé et long, plus la reconstitution du latex avant la saignée suivante devra être importante (figure 34). Plusieurs études axées sur la compréhension des mécanismes de régulation de ces deux paramètres ont été entreprises et des modèles explicatifs ont été proposés (d'Auzac *et al.*, 1989). Ce travail de thèse contribue à l'enrichissement des connaissances de bases, dans une perspective d'amélioration du rendement de la production de latex. Par conséquent, les données moléculaires acquises sur la composante « transporteur de molécules carbonées » seront discutées dans une démarche intégrative, en tenant compte des aspects de production de latex, de fonctionnement des cellules laticifères et d'interaction avec les cellules avoisinantes. La discussion sera déclinée en trois points, fondés essentiellement sur les rôles potentiels des principales isoformes de transporteurs de sucres : *HbSUT1B*, *HbHXT1* et de polyols : *HbPLT2*, dans ce processus de production.

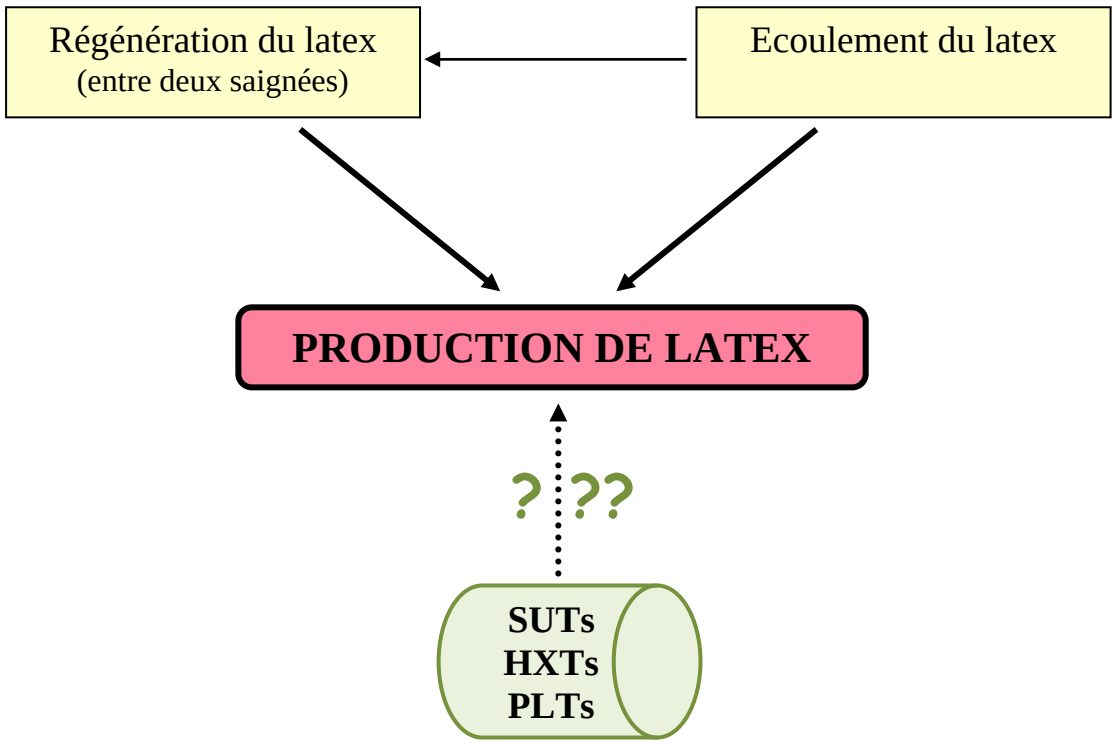


Figure 34 : Les deux paramètres majeurs régulant la production de latex au sein des cellules laticifères

SUTs : Co-transporteurs H+/ saccharose
HXTs : Co-transporteurs H+/hexoses
PLTs : Co-transporteurs H+/polyols

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

Les transporteurs de saccharose contribueraient à la production de latex

Comme mentionné précédemment, un des deux facteurs limitant de la production de latex est la régénération de celui-ci entre deux saignées. Ce processus complexe est contrôlé par plusieurs paramètres plus ou moins finement caractérisés. Les plus significatifs sont le pH cytosolique (Tupy, 1973a ; Primot, 1977b), les équilibres ioniques (Chrestin, 1984 ; Chrestin *et al.*, 1984 a et b), la disponibilité en ATP et en NADPH (Chrestin et Bangratz, 1988) et surtout la disponibilité en saccharose (Tupy, 1973b). La concentration intracellulaire en saccharose représente le bilan de l'influx des sucres dans les cellules laticifères et de leur intégration dans le métabolisme cellulaire, et serait fortement contrôlée par l'activité des transporteurs de sucres de ces cellules laticifères. Le criblage d'une banque d'ADNc de latex nous a permis d'identifier sept transporteurs putatifs de saccharose dans les cellules laticifères, appartenant aux trois groupes de SUTs : *HbSUT1A* et *HbSUT1B* (groupe SUT1) ; *HbSUT2A*, *HbSUT2B* et *HbSUT2C* (groupe SUT2) ; *HbSUT4* et *HbSUT5* (groupe SUT4) ; et un transporteur putatif d'hexoses *HbHXT1*. La présence au sein du même type cellulaire de tous ces transporteurs souligne leur caractère important dans la physiologie des cellules laticifères.

- ***HbSUT1B* serait un acteur important de la production de latex**

Parmi les sept isoformes de transporteurs putatifs de saccharose isolées, seul *HbSUT1B* présente une accumulation forte et spécifique de transcrits dans le latex des arbres exploités du clone PB217, en condition de production stimulée à l'éthylène. Cette induction de *HbSUT1B* est concomitante à l'augmentation de la production de latex, indiquant que ce transporteur putatif de saccharose pourrait intervenir dans la régulation de la production de latex. En effet, la stimulation à l'éthylène induit d'abord une activation du catabolisme glucidique (Tupy et Primot, 1982) puis une augmentation de la concentration en saccharose du latex (Tupy, 1969b, Tupy, 1973 a et c, Tupy et Primot, 1976 ; Low et Gomez, 1982), alors que les cellules laticifères ne disposent d'aucune forme de réserve carbonée. Ces changements métaboliques reflètent une forte augmentation de la force puits de ces cellules (Silpi *et al.*, 2006 et 2007), liée à l'accroissement de leurs besoins en saccharose (Tupy et Primot, 1976 ; Low et Gomez, 1982). La force puits d'un organe est définie par la capacité intrinsèque de l'organe à importer les assimilats (Ho, 1988). Cette capacité intrinsèque est déterminée au moins en partie par l'expression des gènes de transporteurs de sucres, en l'occurrence des transporteurs de saccharose (Decourteix *et al.*, 2006 et 2008), ce qui implique l'importance de

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

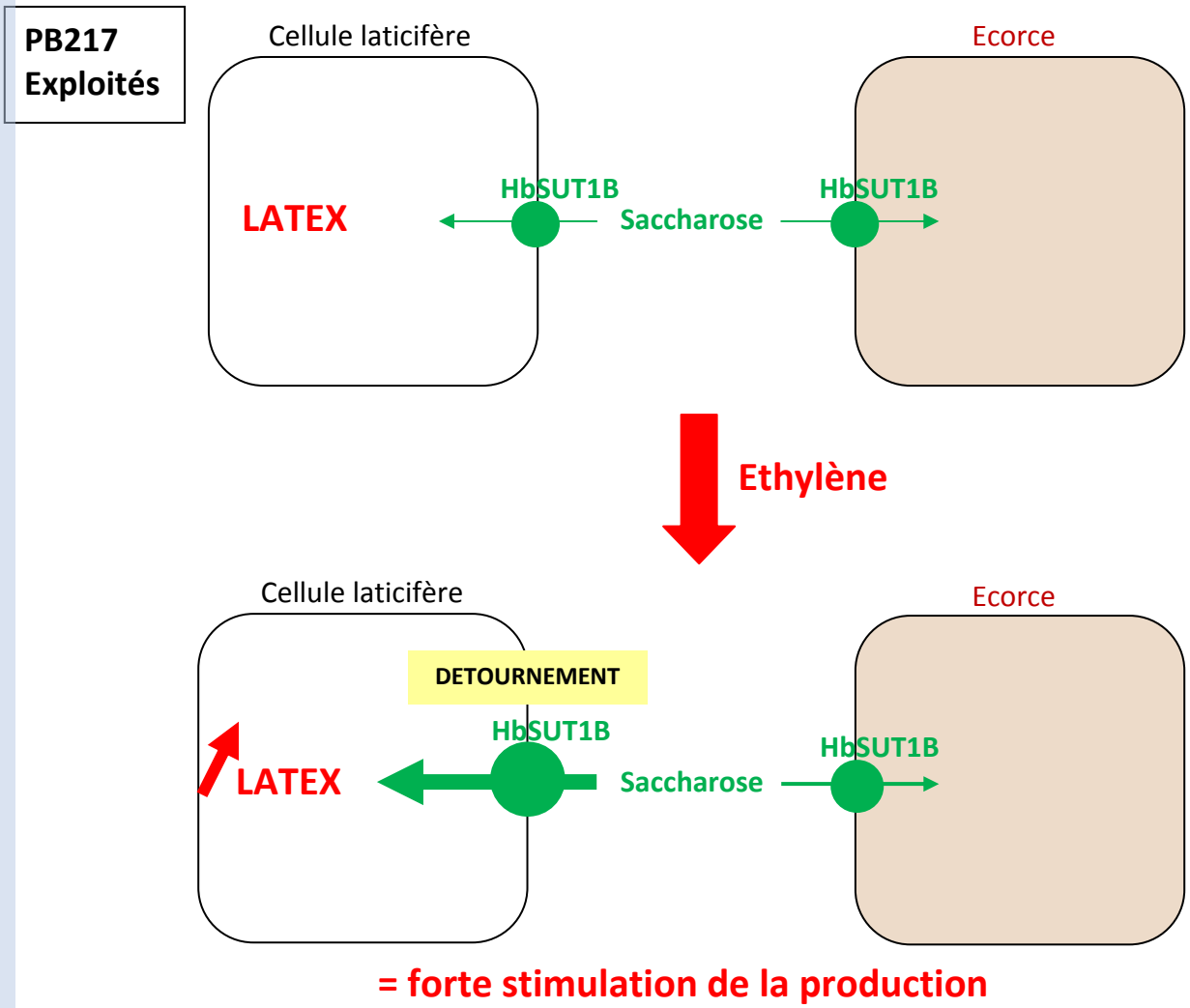


Figure 35 : Schéma de la réponse de HbSUT1B à la stimulation éthylénique de la production, dans des arbres exploités du clone PB217

Ce schéma repose sur les études de la quantités de transcrits du transporteur *HbSUT1B* et a été étendu aux protéines, puisqu'il a souvent été montré que la quantité de transcrits des transporteurs de sucres est corrélée à la quantité de protéines et à l'activité correspondante.
Les transporteurs de saccharose représentés sont des co-transporteurs H^+/saccharose, qui prennent en charge un proton pour une molécule de saccharose mais dans un souci de clarté du schéma, une simple flèche indique ce co-transport.
La taille des cercles représente la différence relative entre les deux tissus.

HbSUT1B : co-transporteur H^+/saccharose

DETOURNEMENT indique une déviation du flux de carbone impliqué dans la régénération

ces transporteurs dans la stimulation de la production. La combinaison de toutes ces données de la littérature et de nos résultats, nous a conduit à émettre **l'hypothèse de l'importance de *HbSUT1B* pour la production du latex**. Bien que toutes les tentatives entreprises pour démontrer la fonction de ce transporteur ont jusqu'à présent échoué, nous avons appris, lors du congrès « International Rubber Research Development Board » qui s'est tenu à Kuala Lumpur en octobre 2008, que des collègues du CATAS (Chinese Academy of Tropical Agricola Sciences) ont réussi à démontrer que HbSUT1B transporte effectivement le saccharose. De plus, il a déjà été montré pour d'autres gènes du latex, comme REF (Rubber Elongation Factor) qu'une accumulation des transcrits pouvait être corrélée à une implication dans le processus de production de latex (Priya *et al.*, 2006). Par conséquent, nous considérons que HbSUT1B est un transporteur de saccharose fonctionnel, ce qui renforce notre hypothèse quant à son importance potentielle dans les cellules laticifères.

Comme nous l'avons déjà rapporté, le saccharose est la molécule carbonée prépondérante des cellules laticifères (Tupy et Resing, 1969 ; Bealing, 1969). Il constitue l'unique précurseur de la voie de biosynthèse du caoutchouc mais également une source de carbone incontournable pour le métabolisme cellulaire (Lynen, 1969 ; Tupy et Primot, 1976). Son rôle primordial dans la régénération du latex a déjà été démontré (Yeang *et al.*, 1984, Tupy, 1984, 1985, 1989 ; Eschbach *et al.*, 1986). De plus, les cellules laticifères étant dépourvues de plasmodesme (de Faÿ et Jacob, 1989 ; Pickard, 2008), le rôle d'un transporteur actif dans le chargement en saccharose des cellules laticifères est central (Lacrotte, 1991 ; Bouteau *et al.*, 1992). Etant donné le rôle supposé de *HbSUT1B* dans la production de latex et que l'augmentation de la quantité de transcrits de celui-ci a lieu dans le latex des arbres exploités (PB217) et non dans l'écorce (puits compétiteur de la régénération), nous suggérons que **ce transporteur de saccharose interviendrait dans la production de latex en régulant le processus de régénération**. Ces résultats corrélatifs et le fait que *HbSUT1B* soit l'isoforme la plus abondante dans le latex et dans l'écorce du clone PB217, suggèrent que *HbSUT1B* interviendrait dans la production de latex, en détournant le flux de saccharose au profit des cellules laticifères, site de la régénération du latex. Cette régulation spatiale de *HbSUT1B* ferait des cellules laticifères un site puits de première importance dans le dispositif cellulaire des tissus de l'écorce, notamment en condition de forte production de latex (figure 35).

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

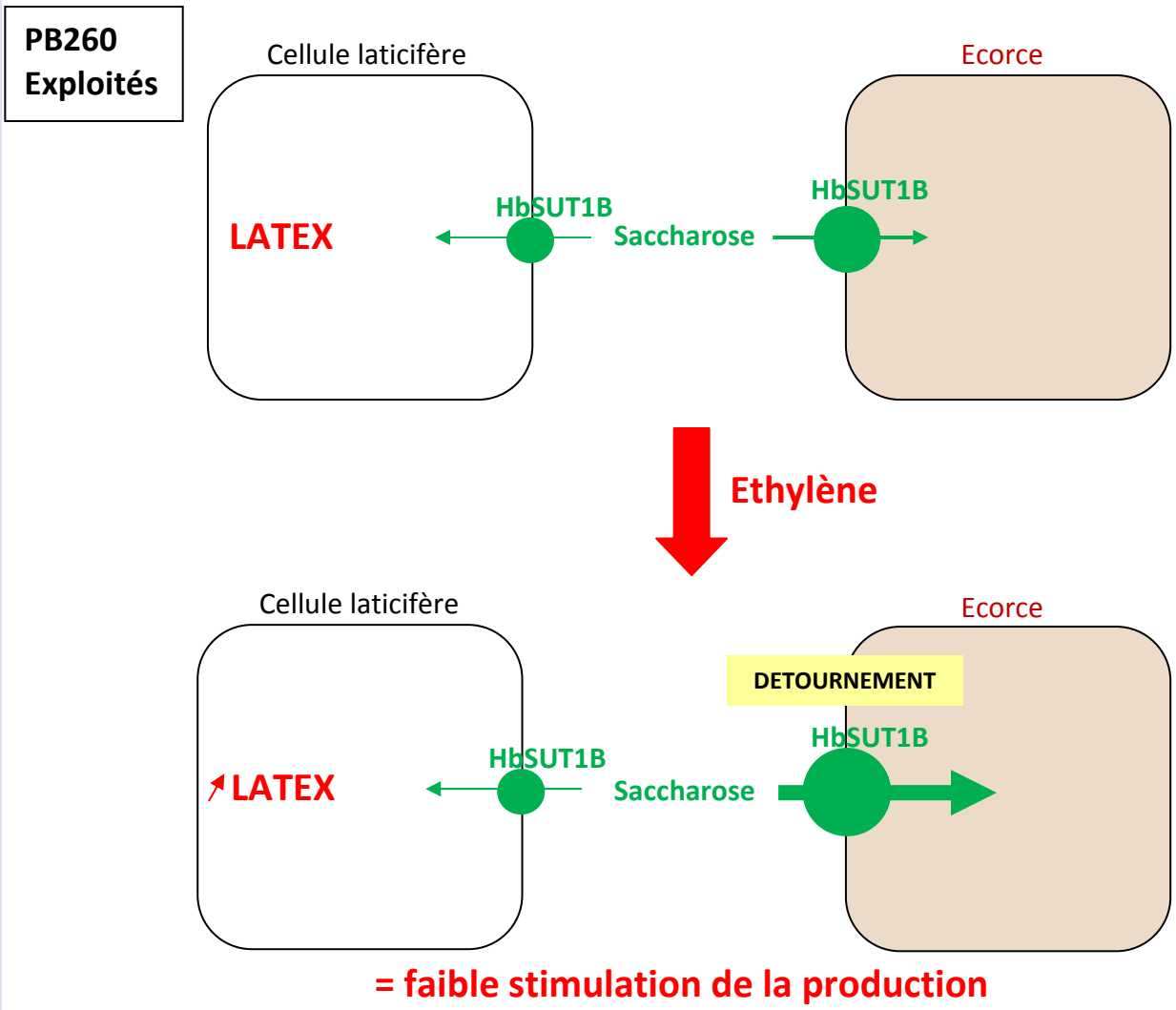


Figure 36 : Schéma de la réponse de HbSUT1B à la stimulation éthylénique de la production, dans des arbres exploités du clone PB260

Ce schéma repose sur les études de la quantités de transcrits du transporteur *HbSUT1B* et a été étendu aux protéines, puisqu'il a souvent été montré que la quantité de transcrits des transporteurs de sucres est corrélée à la quantité de protéines et à l'activité correspondante.
Les transporteurs de saccharose représentés sont des co-transporteurs H^+/saccharose, qui prennent en charge un proton pour une molécule de saccharose mais dans un souci de clarté du schéma, une simple flèche indique ce co-transport.
La taille des cercles représente la différence relative entre les deux tissus.

● HbSUT1B : co-transporteur H^+/saccharose

DETOURNEMENT indique une déviation du flux de carbone impliqué dans la régénération

***HbSUT1B* serait responsable de l'orientation du flux de saccharose**

L'hévéa est une plante encore difficilement transformable et la validation fonctionnelle de notre hypothèse par des stratégies de perte et/ou de gain de fonction ne peut pas s'opérer sur d'autres plantes en raison de la nature spécifique du mécanisme de production de latex. Toutefois, afin de tester la robustesse de notre modèle, la réponse à la stimulation éthylénique de *HbSUT1B* a été étudiée chez des arbres exploités du clone PB260. Ce clone a été choisi car il a un comportement très contrasté de celui de PB217. Contrairement à PB217, PB260 est peu sensible à la stimulation éthylénique (Gohet, 2003). Dans notre contexte scientifique, l'origine de cette différence de réponse à l'éthylène en terme de production de latex entre les deux clones (PB217 et PB260) pourrait être liée à une différence de régulation des transporteurs de saccharose et particulièrement de *HbSUT1B*. Les résultats obtenus suite à l'application de l'éthylène confortent notre hypothèse. En effet, et contrairement à ce qui se passe chez PB217, l'accumulation des transcrits de *HbSUT1B* a lieu essentiellement dans l'écorce de PB260. L'absence de stimulation de l'expression de *HbSUT1B* dans les cellules laticifères de PB260 en réponse à l'éthylène, corrélée à une augmentation plus faible de la production de latex, semble renforcer l'hypothèse de l'implication de *HbSUT1B* dans la production de latex. Dans le cas du clone PB260, nous proposons que la forte stimulation de *HbSUT1B* dans les cellules de l'écorce entrainerait une augmentation de la force puits de ces cellules, au détriment des cellules laticifères. Le détournement du flux de saccharose vers l'écorce, peut limiter l'entrée du saccharose dans les cellules laticifères et potentiellement expliquer la faible augmentation de production, alors que le métabolisme glucidique des cellules laticifères est augmenté (figure 36). ***HbSUT1B* agirait sur la production en orientant le flux de saccharose, indispensable à la régénération.**

***HbSUT1B* serait la cible moléculaire d'un processus d'adaptation à l'exploitation**

Nos résultats ont clairement montré que la stimulation de l'expression de *HbSUT1B* s'opère chez les arbres exploités (deux ans d'exploitation), alors que chez les arbres vierges (jamais saignés) aucune stimulation de son expression n'a été observée malgré une certaine augmentation de la production de latex. Au contraire, l'expression de *HbSUT1B* est diminuée durant la cinétique du traitement. En revanche, d'autres isoformes se sont révélées importantes chez ces arbres (*HbSUT1A* et *HbSUT2A*), alors que leur niveau d'expression de base est très faible, en comparaison avec celui de *HbSUT1B*. Une absence de stimulation de

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

HbSUT1B a également été observée chez les arbres dont l'exploitation est récente (4 mois d'exploitation, résultats non montrés). Cette réponse différentielle de *HbSUT1B* montre le caractère complexe et intégratif de la régulation de ce transporteur de saccharose.

Les plantes sont capables de répondre et de s'adapter à des stress biotiques et abiotiques récurrents. Ces réponses sont contrôlées au niveau moléculaire par des modifications de l'expression de gènes (Bruce *et al.*, 2007). Ce phénomène, désigné par « stress imprint », est défini comme les modifications génétiques ou biochimiques chez une plante qui interviennent après une exposition à des stress répétés et qui induisent des réponses différentes aux stress ultérieurs (Bruce *et al.*, 2007). Deux mécanismes sont proposés pour expliquer l'évolution de la régulation des gènes : i) l'accumulation de protéines de signal ou de facteurs de transcription (Ton *et al.*, 2005 ; Conrath *et al.*, 2006) et ii) des modification épigénétiques (Reyes *et al.*, 2002). Au vu de la différence de réponse de *HbSUT1B* à l'éthylène chez les arbres vierges et les arbres exploités (PB217), nous pouvons imaginer que l'accumulation de transcrits de ***HbSUT1B* serait régulée par l'exploitation et non pas directement par l'éthylène**. Les arbres s'adapteraient au moins en terme de quantité de transcrits de *HbSUT1B* au stress répété de l'exploitation.

***HbSUT1B* pourrait également être régulé par le taux de production**

Bien que cette hypothèse soit très plausible, une autre hypothèse est également envisageable, si l'on considère l'aspect quantitatif de l'augmentation de la production par l'éthylène. Effectivement, la production de latex chez les arbres vierges (max. 200 g.saignée^{-1}.arbre^{-1}) est 2,5 fois moins stimulée par l'éthylène que la production chez les arbres exploités (max. 500 g.saignée^{-1}.arbre^{-1}) et la stimulation est plus tardive (16 h contre 4 h chez les arbres exploités). Par conséquent, il apparaît que ***HbSUT1B* pourrait être induit dans les situations de forte production**, indépendamment de l'état d'exploitation de l'arbre. Il a déjà été démontré que plusieurs isoformes de transporteurs de saccharose pouvaient être régulées différemment au cours d'un processus physiologique, en fonction de l'évolution de la demande en carbone. Par exemple, chez la vigne, lors du mûrissement de la baie de raisin, trois isoformes de transporteurs de saccharose sont exprimées à différents stades. *VvSUC27* (*Vitis vinifera* Sucrose Carrier 27) est l'isoforme prépondérante dans les stades précoces de développement du fruit ; alors que pendant la phase d'accumulation rapide des hexoses dans la vacuole qui correspond à une augmentation importante de la force puits (post-véraison) les

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

PB217
Exploités

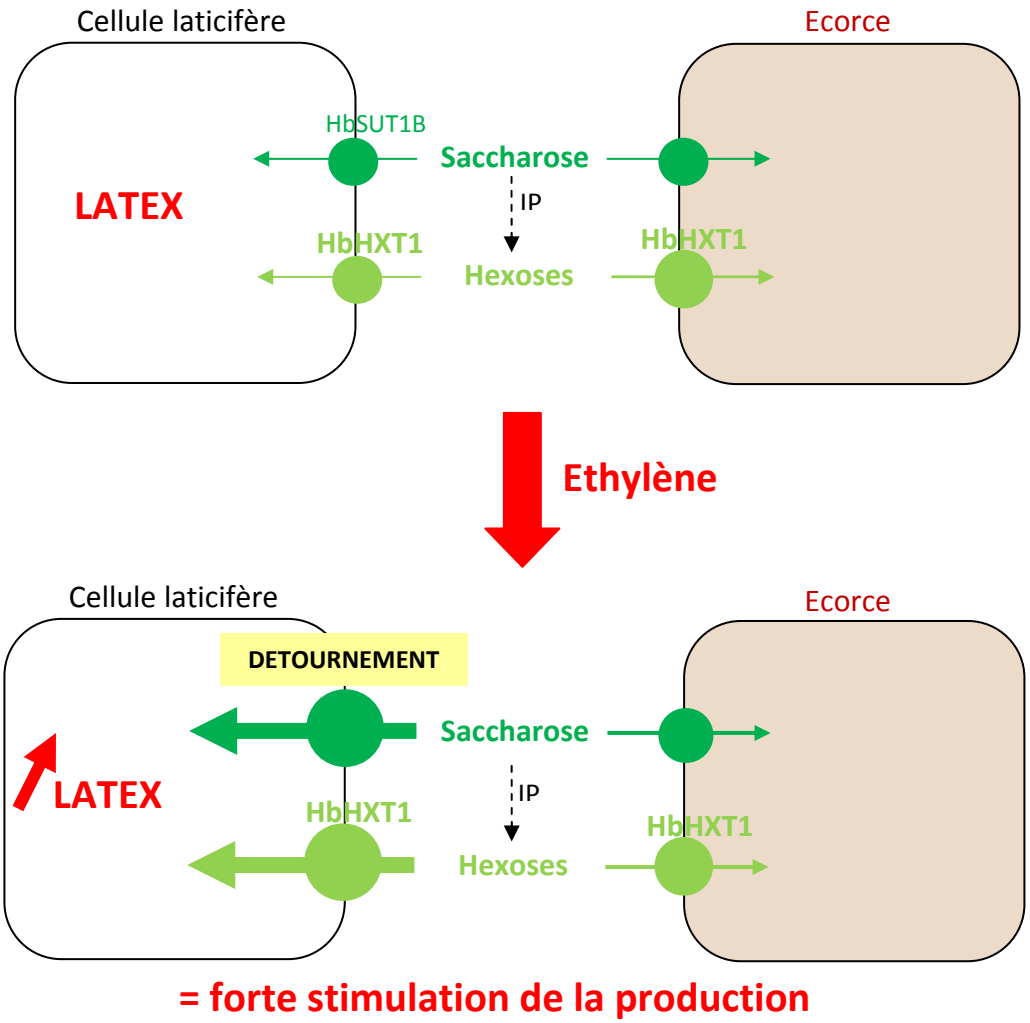


Figure 37 : Schéma de la réponse de HbHXT1 à la stimulation éthylénique de la production, dans des arbres exploités du clone PB217

Ce schéma repose sur les études de la quantités de transcrits du transporteur *HbSUT1B* et a été étendu aux protéines, puisqu'il a souvent été montré que la quantité de transcrits des transporteurs de sucres est corrélée à la quantité de protéines et à l'activité correspondante.
Les transporteurs de sucres représentés sont des co-transporteurs H^+/sucres, qui prennent en en charge un proton pour une molécule de sucre mais dans un souci de clarté du schéma, une simple flèche indique ce co-transport.
La taille des cercles représente la différence relative entre les deux tissus.

HbSUT1B : co-transporteur H^+/saccharose

HbHXT1 : co-transporteur H^+/hexoses

DETOURNEMENT indique une déviation du flux de carbone impliqué dans la régénération

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

isoformes *VvSUC11* et *VvSUC12* sont fortement exprimées et *VvSUC27* réprimée (Davies *et al.*, 1999).

Cette seconde hypothèse pourrait également expliquer les résultats obtenus chez les arbres vierges traités par différentes hormones. Ces études indiquent que la quantité de transcrits de *HbSUT1B* augmente essentiellement en présence d'acide jasmonique et d'auxine, deux molécules connues pour leurs effets très stimulateurs de la production de latex (Abraham et Taylera, 1967 ; Tupy et Resing, 1969) en comparaison à celui de l'éthylène. Il semblerait alors que la stimulation de la quantité de transcrits de *HbSUT1B* soit possible chez les arbres vierges et coïncide plutôt avec des taux de production de latex élevés. Nous pouvons donc imaginer que le déclenchement de l'accumulation des transcrits de *HbSUT1B* dans les cellules laticifères serait lié à une demande accrue en saccharose, nécessaire à la forte production de latex. L'accroissement de la demande serait elle-même liée à une diminution de la concentration en saccharose, due à sa forte métabolisation. Cette baisse de la concentration intracellulaire de saccharose serait à l'origine de la stimulation de l'expression de *HBSUT1B*. Un tel modèle de régulation a été observé dans les feuilles de betteraves (Chiou et Bush , 1998) et dans les cotylédons de pois en développement (Zhou *et al.*, 2009), impliquant probablement des processus de perception via des senseurs de sucres tels que le complexe protéique SnrK1.

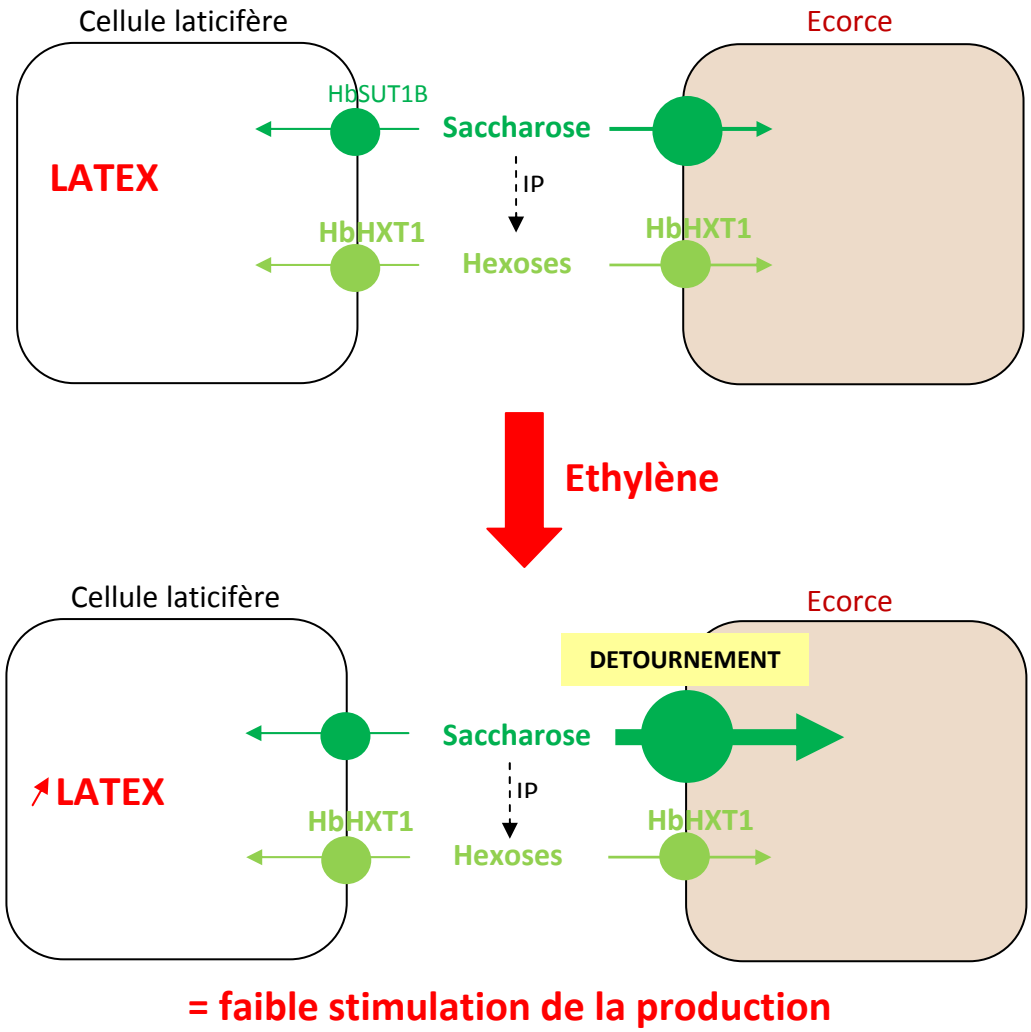
Les résultats obtenus sur les arbres vierges, les arbres exploités des deux clones d'hévéa (PB217 et PB260) sont autant d'arguments en faveur d'un rôle de *HbSUT1B* dans la régénération du latex et ainsi dans la production de celui-ci. Son expression serait principalement contrôlée par les événements liés à l'exploitation et à l'intensité de la production elle-même. **Par conséquent, *HbSUT1B* pourrait être un marqueur de production de latex.**

***HbHXT1* représenterait une seconde voie pour optimiser la production de latex**

Dans le même cadre d'étude, le profil d'expression de *HbHXT1* était quasiment le même que celui de *HbSUT1B*. En effet, en réponse à la stimulation éthylénique, une accumulation des transcrits de *HbHXT1* a été constatée uniquement dans le latex d'arbres exploités du clone PB217. Aucune régulation n'a été trouvée dans les cellules de l'écorce du même clone. Comme *HbSUT1B*, ce transporteur putatif d'hexoses pourrait également

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

PB260 Exploités



= faible stimulation de la production

Figure 38 : Schéma de la réponse de HbHXT1 à la stimulation éthylénique de la production, dans des arbres exploités du clone PB260

Ce schéma repose sur les études de la quantités de transcrits du transporteur *HbSUT1B* et a été étendu aux protéines, puisqu'il a souvent été montré que la quantité de transcrits des transporteurs de sucres est corrélée à la quantité de protéines et à l'activité correspondante.
Les transporteurs de sucres représentés sont des co-transporteurs H^+/sucres, qui prennent en en charge un proton pour une molécule de sucre mais dans un souci de clarté du schéma, une simple flèche indique ce co-transport.
La taille des cercles représente la différence relative entre les deux tissus.

- HbSUT1B : co-transporteur H^+/saccharose
- HbHXT1 : co-transporteur H^+/hexoses

DETOURNEMENT indique une déviation du flux de carbone impliqué dans la régénération

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

participer à la production de latex, en augmentant la capacité d'attraction des nutriments carbonés par les cellules laticifères (figure 37).

Les résultats obtenus chez les arbres exploités du clone PB260 n'indiquent aucune régulation de *HbHXT1* ni dans le latex, ni dans l'écorce de ce clone en réponse à la stimulation éthylénique. Contrairement à *HbSUT1B*, *HbHXT1* ne serait donc pas un acteur du détournement du sucre soluble vers les cellules de l'écorce, au détriment des cellules laticifères. Par conséquent, au premier modèle basé uniquement sur le rôle de *HbSUT1B* dans la production de latex, nous pouvons rajouter l'implication de *HbHXT1*, en tant qu'acteur moléculaire permettant l'augmentation de l'influx de matière première glucidique dans les cellules laticifères, qui agirait en synergie avec *HbSUT1B* (figure 38). Ce transporteur pourrait donc renforcer la force puits des cellules laticifères, nécessaire à la stimulation de la production de latex par l'éthylène chez le clone PB217. Des modèles similaires basés sur l'optimisation de l'influx de sucres solubles ont été rapportés dans la littérature. Par exemple, les deux types de transporteurs ont été identifiés dans des organes à la force puits élevée, comme la baie de raisin en véraison (Davies *et al.*, 1999) ou encore dans le xylème du noyer au moment du débourrement (Decourteix *et al.*, 2008).

A l'instar de *HbSUT1B*, la régulation de *HbHXT1* semble être complexe au regard des résultats obtenus chez les arbres vierges et exploités. L'expression de *HbHXT1* est fortement stimulée dans les cellules laticifères des arbres exploités alors qu'aucune régulation n'a été observée chez les arbres vierges en réponse à l'éthylène. Ceci implique que la régulation de *HbHXT1* ne serait pas due à l'application de l'éthylène mais probablement aux événements liés à une forte production et à l'exploitation.

<u>Les transporteurs de polyols contribueraient à la production de latex, en régulant l'écoulement</u>

Contrairement au saccharose, le quebrachitol ne semble pas intervenir dans la biosynthèse de caoutchouc mais plutôt dans la régulation de la pression de turgescence des cellules laticifères (Sheldrake, 1978 ; Low, 1978). Ce paramètre est essentiel puisqu'il conditionne la composante « écoulement » de la production de latex. En effet, la facilité et la durée de l'écoulement vont déterminer la quantité de latex récolté lors de la saignée et par conséquent, la quantité de latex à régénérer avant la future saignée. La cause principale de

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

l'arrêt de l'écoulement semble être l'obstruction de l'extrémité sectionnée des laticifères par des microfloculats de particules de caoutchouc agrégées (Buttery et Boatman, 1966), due essentiellement à la libération du contenu des lutoïdes dans le cytosol (Southorn et Edwin, 1968 ; Southorn et Yip, 1968 ; d'Auzac, 1989a, Gidrol *et al.*, 1994). Différentes causes sont susceptibles d'induire la dégradation des lutoïdes, notamment leur osmosensibilité (Pakianathan *et al.*, 1966 ; Gomez et Southorn, 1969), un effet mécanique de laminage (Yip et Southorn, 1968) et la libération du contenu des cellules de l'écorce sectionnée (Cook et Mc Mulen, 1951 ; Gomez, 1977 ; Yip et Gomez, 1984). Le quebrachitol joue un rôle essentiel dans la régulation de la pression osmotique. Ce principal composé soluble du latex, ainsi que le transporteur qui assure son influx, pourraient participer au contrôle de la stabilité des lutoïdes et par conséquent à l'écoulement. Sur les deux isoformes de transporteurs de polyols isolées dans les cellules laticifères, *HbPLT2* serait potentiellement impliqué dans le processus étudié.

HbPLT2 transporterait le quebrachitol

Contrairement aux transporteurs de saccharose et d'hexoses, peu de données sont aujourd'hui disponibles sur la fonctionnalité des transporteurs de polyols. De plus, selon les isoformes, les transporteurs de polyols connus sont capables d'assurer le transport de divers substrats (Chauhan *et al.*, 2000; Gao *et al.*, 2003 ; Klepek *et al.*, 2005 ; Reinders *et al.*, 2005 ; Juchaux-Cachau *et al.*, 2007, Schneider *et al.*, 2008). Aussi, nous avons tenté de caractériser l'activité de transport de HbPLT2 en système hétérologue levure. Les premiers résultats, obtenus tendent à indiquer que HbPLT2 serait un nouveau transporteur de polyols, spécifique du quebrachitol. En effet, HbPLT2 ne prend en charge ni le mannitol, ni le sorbitol (contrairement aux transporteurs de polyols aliphatiques), ni les hexoses (contrairement aux transporteurs de polyols de type AtPLT5), ni le *myo*inositol (contrairement aux transporteurs de polyols cyclique). En revanche, HbPLT2 transporte avec une forte affinité le xylitol, un polyol aliphatique absorbé par la majorité des transporteurs de polyols (Dr. Rémi Lemoine, communication personnelle). Ce transport du xylitol est très fortement diminué en présence de quebrachitol. Par conséquent nous avons émis l'hypothèse que HbPLT2 serait un transporteur fonctionnel, spécifique du quebrachitol.

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

PB217 Exploités

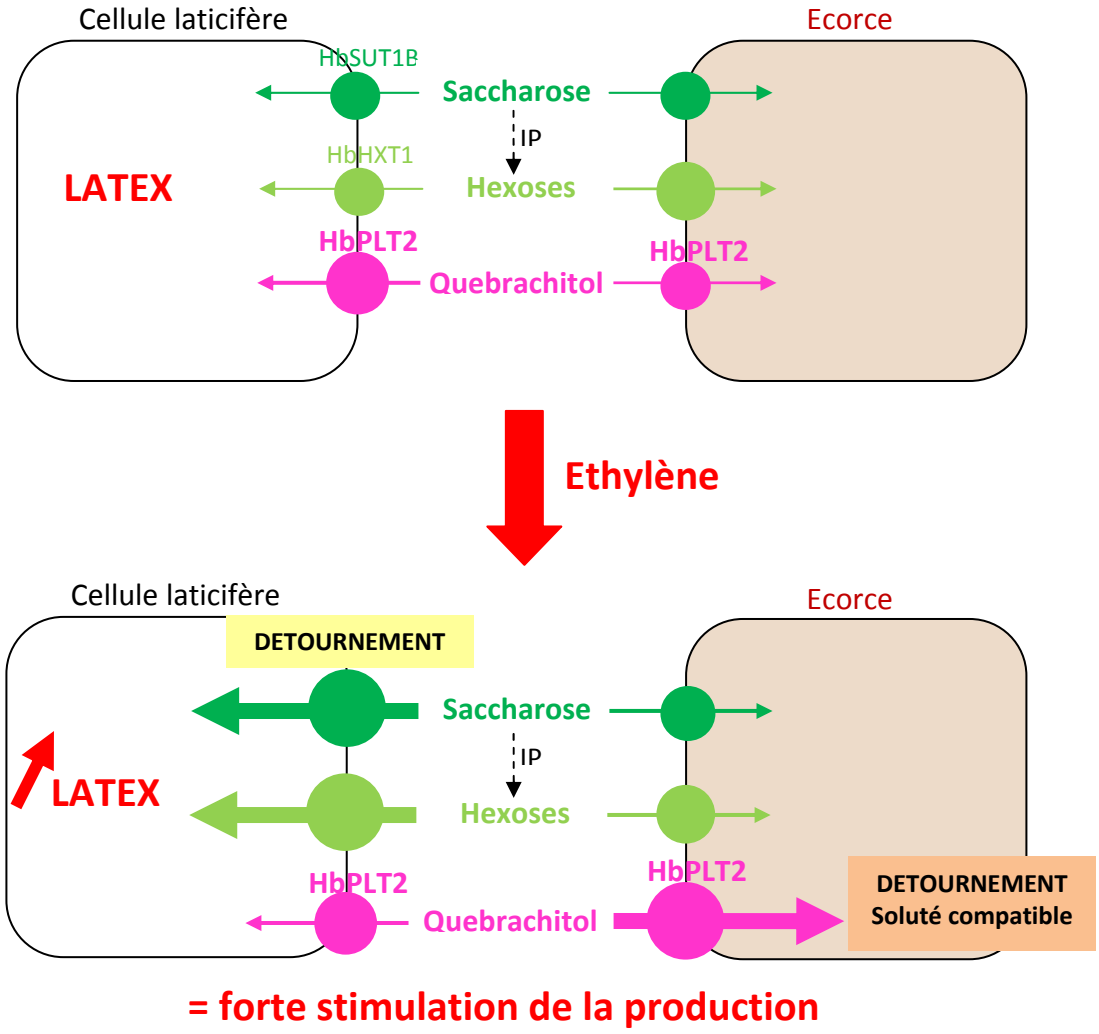


Figure 39 : Schéma de la réponse de HbPLT2 à la stimulation éthylénique de la production, dans des arbres exploités du clone PB217

Ce schéma repose sur les études de la quantités de transcrits du transporteur *HbSUT1B* et a été étendu aux protéines, puisqu'il a souvent été montré que la quantité de transcrits des transporteurs de sucres est corrélée à la quantité de protéines et à l'activité correspondante.
Les transporteurs de polyols représentés sont des co-transporteurs H^+/quebrachitol, qui prennent en charge un proton pour une molécule de quebrachitol mais dans un souci de clarté du schéma, une simple flèche indique ce co-transport.
La taille des cercles représente la différence relative entre les deux tissus.

- HbSUT1B : co-transporteur H^+/saccharose
- HbHXT1 : co-transporteur H^+/hexoses
- HbPLT2 : co-transporteur H^+/quebrachitol

DETOURNEMENT indique une déviation du flux de carbone impliqué dans la régénération

DETOURNEMENT Soluté compatible indique une déviation du flux de carbone lié à la pression osmotique

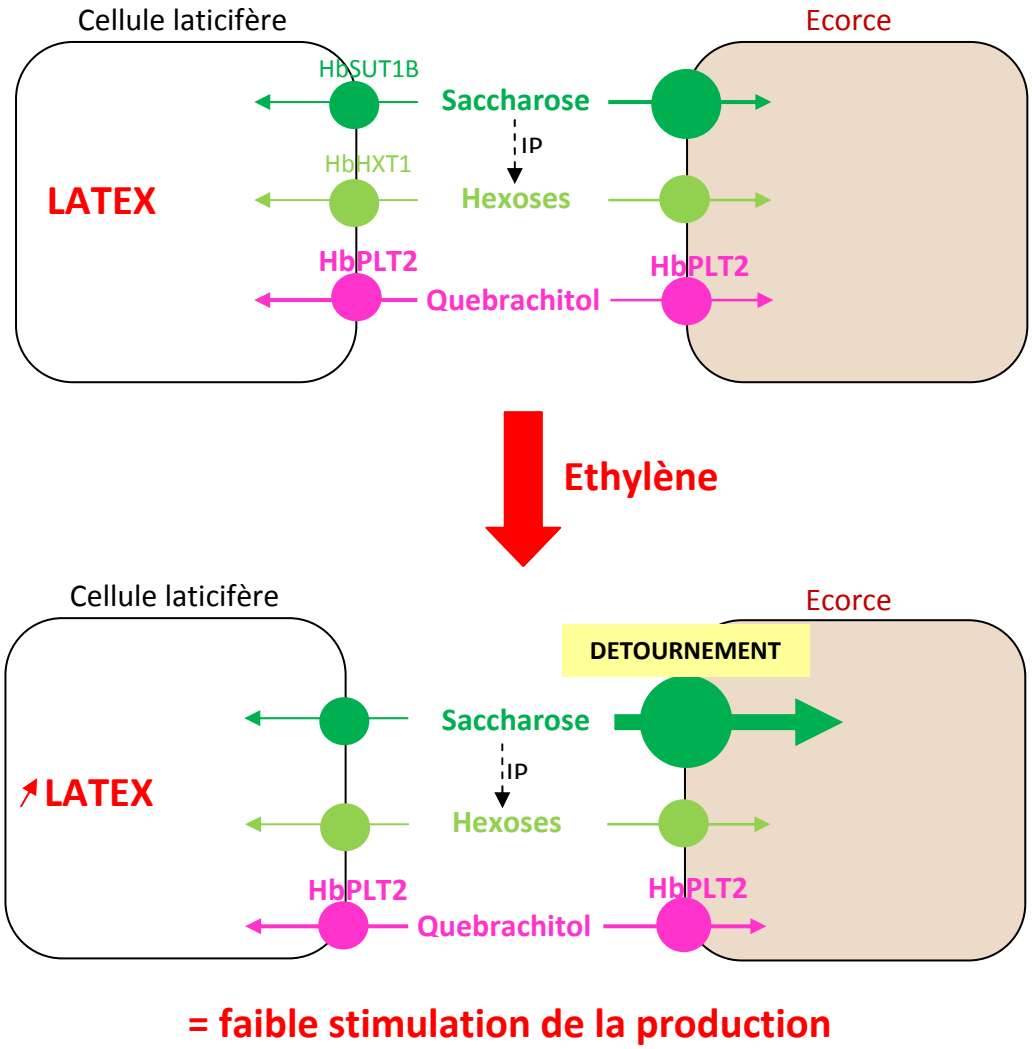
***HbPLT2* contribuerait à la régulation de l'écoulement**

L'étude de l'accumulation des transcrits chez les arbres exploités du clone PB217, après stimulation de la production à l'éthylène, a révélé une faible induction de *HbPLT2* dans le latex, mais très forte dans l'écorce. Par conséquent le flux de quebrachitol, serait orienté vers les tissus de l'écorce au détriment des cellules laticifères. Une telle régulation spatiale en faveur des cellules de l'écorce s'accompagnerait d'un accroissement de l'écoulement selon le modèle suivant : 1) la diminution de la quantité de quebrachitol des cellules laticifères, conduirait à une diminution relative de la pression osmotique intra-laticifère et éviterait ainsi l'éclatement ou la désorganisation des membranes des lutoïdes et 2) l'accumulation du quebrachitol dans l'écorce permettrait également de diminuer l'approvisionnement en eau des cellules laticifères et de moduler ainsi leur pression de turgescence. Ces hypothèses sont en accord avec des observations montrant que la déstabilisation des structures lutoïdiques est provoquée aussi par un flux massif d'eau vers les cellules laticifères, qui entraîne une perméabilisation des membranes lutoïdiques (Pakianathan *et al.* 1966). D'autre part, des études menées sur l'expression des aquaporines indiquent également une réduction de l'accumulation de ces protéines dans les cellules laticifères du même clone PB217 et dans les mêmes conditions expérimentales (Dr. Hervé Chrestin, communication personnelle). Tous ces éléments convergent pour suggérer que la diminution du flux d'eau dans les laticifères, protège l'intégrité des membranes des lutoïdes, garantissant ainsi un écoulement prolongé. ***HbPLT2* interviendrait dans la production de latex en régulant l'allocation du quebrachitol** (un agent osmotiquement actif) aux cellules laticifères **et donc l'écoulement** du latex (figure 39). Dans la littérature, il a déjà été montré que des polyols « exotiques » pouvaient intervenir dans des processus de régulation similaires. Par exemple, l'eucalyptus est une espèce qui accumule le quercitol (polyol cyclique) pour ajuster sa pression osmotique en réponse au stress hydrique (Arndt *et al.*, 2008). Toutefois, les transporteurs impliqués n'ont pas été identifiés et les mécanismes moléculaires de ce processus restent à élucider.

Afin de confirmer notre hypothèse, nous avons analysé la réponse de *HbPLT2* à l'éthylène dans des arbres exploités du clone PB260, dont la production est plus faiblement stimulée par cette hormone. Comparativement aux résultats obtenus chez PB217, une faible accumulation des transcrits de *HbPLT2* a été mise en évidence uniquement dans l'écorce en deuxième récolte chez les arbres exploités du clone PB260. Ce résultat semble renforcer notre hypothèse de l'implication de *HbPLT2* dans la production stimulée de latex puisque dans le

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

PB260
Exploités



= faible stimulation de la production

Figure 40 : Schéma de la réponse de HbPLT2 à la stimulation éthylénique de la production, dans des arbres exploités du clone PB260

Ce schéma repose sur les études de la quantités de transcrits du transporteur *HbSUT1B* et a été étendu aux protéines, puisqu'il a souvent été montré que la quantité de transcrits des transporteurs de sucres est corrélée à la quantité de protéines et à l'activité correspondante.
Les transporteurs de polyols représentés sont des co-transporteurs H^+/quebrachitol, qui prennent en charge un proton pour une molécule de quebrachitol mais dans un souci de clarté du schéma, une simple flèche indique ce co-transport.
La taille des cercles représente la différence relative entre les deux tissus.

- HbSUT1B : co-transporteur H^+/saccharose
- HbHXT1 : co-transporteur H^+/hexoses
- HbPLT2 : co-transporteur H^+/quebrachitol

DETOURNEMENT indique une déviation du flux de carbone impliqué dans la régénération

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

cas d'une production moins augmentée par l'éthylène, la quantité de transcrits de ce gène est moins augmentée dans l'écorce (figure 40).

- ***HbPLT2* serait régulé par l'éthylène et problablement par les contraintes osmotiques**

Nous avons mis en évidence que le profil d'expression de *HbPLT2* en réponse à l'éthylène était très similaire chez les arbres vierges et les arbres exploités du clone PB217, à savoir, une forte accumulation des transcrits de *HbPLT2* a lieu dans les tissus de l'écorce. En nous basant sur le même raisonnement que pour les transporteurs de sucres, nous suggérons que contrairement à *HbSUT1B* et à *HbHXT1*, *HbPLT2* ne serait régulé ni par l'exploitation, ni par l'intensité de la production de latex. En effet, ce gène présente le même profil d'expression en réponse à l'éthylène chez des arbres non exploités dont la stimulation de la production est moyenne (arbres vierges PB217) et chez des arbres exploités depuis deux ans dont la production stimulée est très importante. Par conséquent, nous proposons que ***HbPLT2* serait régulé directement par l'éthylène**, indépendamment de la production et de l'exploitation. Cette hypothèse est corroborée par l'existence de quatre éléments *cis* de régulation par l'éthylène sur le promoteur de *HbPLT2*. Il s'agit d'élément ERELEE4, décrits pour la première fois chez l'œillet, chez lequel ils sont impliqués dans l'activation de la transcription de la gluthation-S-transferase par l'éthylène (Itzhaki *et* al., 1994). Finalement, étant donné le rôle supposé de *HbPLT2* dans la régulation de la pression osmotique, il est possible que ce gène soit en réalité régulé globalement par les processus impliquant des variations de la pression osmotique. Sa régulation permettrait en dirigeant les flux du principal soluté compatible du latex, d'ajuster la pression osmotique des différents tissus de l'écorce en réponse à des variations de celle-ci. ***HbPLT2* serait un des acteurs moléculaires du maintien de l'homéostasie de la pression osmotique**.

HbPLT2 serait, en résumé, impliqué dans la régulation de la production de latex en agissant sur les paramètres d'écoulement de celui-ci. Nous proposons que ce gène interviendrait dans la réponse à l'éthylène et de façon plus générale dans la réponse à divers stress en permettant l'ajustement de la pression osmotique. **L'utilisation de *HbPLT2* en tant que marqueur moléculaire de production de latex peut également être envisagée**.

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

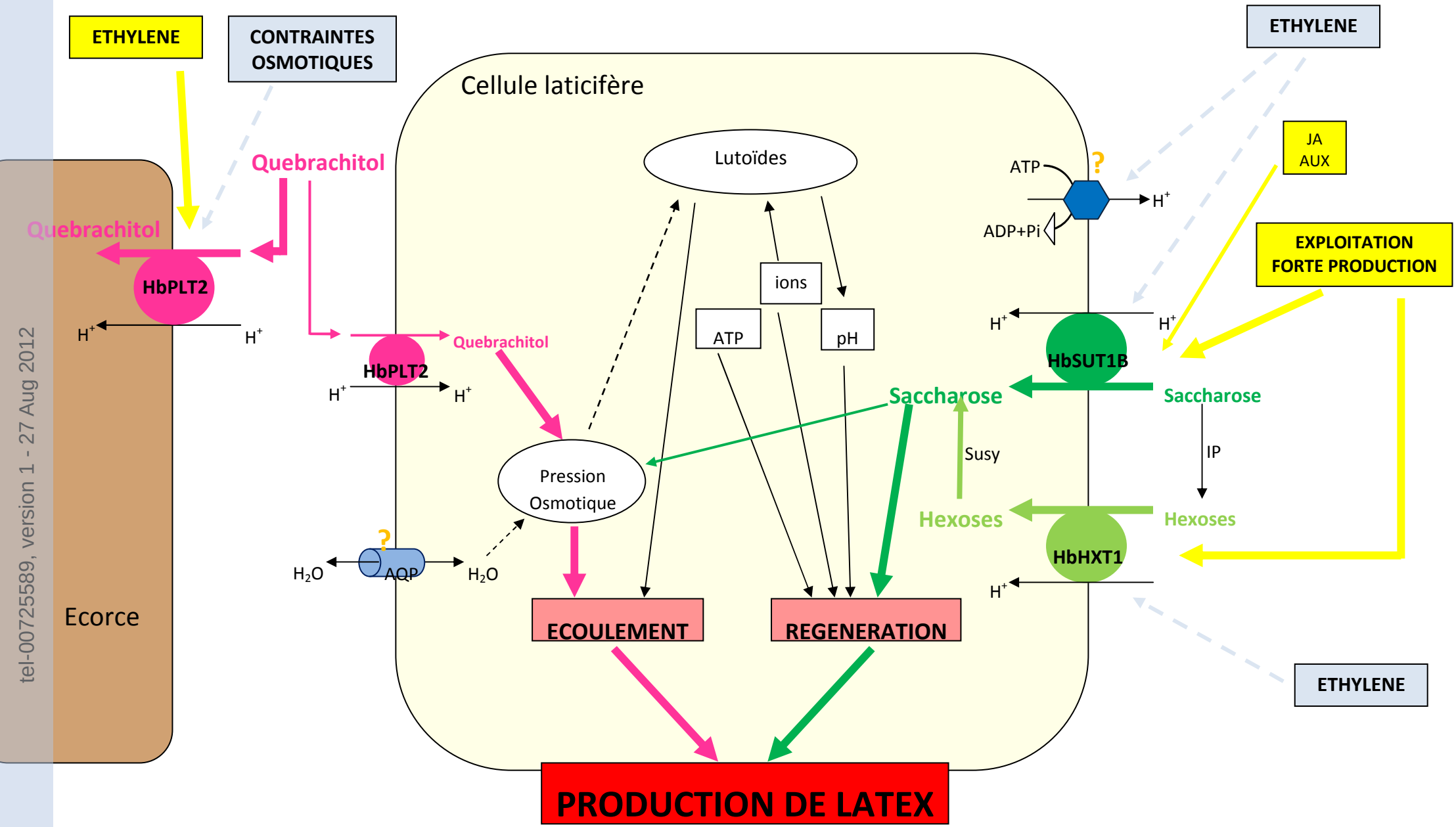


Figure 41 : Modèle intégré de la régulation de la production de latex dans les cellules laticifères

(légende voir p 127)

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

Modèle de régulation de la production du latex dans les cellules laticifères et perspectives

L'aboutissement de ce travail de thèse est la proposition d'un modèle global de fonctionnement des laticifères et de la régulation de la production de latex, intégrant les principaux résultats obtenus. Ce modèle est présenté sous la forme d'un schéma dans la figure 41. Brièvement, *HbSUT1B*, *HbHXT1* et *HbPLT2* seraient impliqués dans la régulation de la production de latex, mais selon deux voies distinctes. *HbPLT2* modulerait les flux d'eau et donc l'écoulement de latex en régulant la distribution du quebrachitol entre les cellules laticifères et les cellules de l'écorce. Ce transporteur interviendrait globalement dans les mécanismes de réponses aux stress. *HbSUT1B* et *HbHXT1* agiraient en synergie sur la régénération en régulant la disponibilité en matière première glucidique. Ces deux gènes seraient régulés par les mécanismes plus directement liés à la production, comme la stimulation éthylénique, les teneurs en sucres endogènes et l'exploitation. Ce modèle propose ainsi une première vision globale des nouveaux acteurs de la production de latex et leurs relations au sein des cellules laticifères d'hévéas exploités (PB217). Ce schéma qui ouvre des perspectives prometteuses pour la compréhension des mécanismes de production, mérite d'être validé et complété pour une meilleure intégration dans un schéma d'amélioration de ce caractère d'intérêt. Dans ce contexte, nous envisageons au moins trois axes d'études complémentaires de ce travail.

Tout d'abord, la validation fonctionnelle de nos trois gènes est nécessaire. La transformation de l'hévéa ne permet pas encore la régénération de plantes entières pouvant être étudiées au champ. De plus, le processus physiologique de production de latex est spécifique de l'hévéa et ne peut être étudié chez les plantes dites « modèles ». Pour surmonter cet obstacle méthodologique, nous nous proposons d'analyser le profil d'expression des gènes candidats selon le même procédé expérimental (éthylène sur des arbres exploités) chez de nombreux autres clones, aux comportements métaboliques contrastés. Un criblage d'au moins un clone de chaque catégorie présentée dans la typologie clonale (tableau I; Gohet *et al.*, 2003) permettrait de vérifier si les profils d'expression de *HbSUT1B*, *HbHXT1* et *HbPLT2* peuvent effectivement refléter l'activité de production de tous les clones et de valider leurs rôles. Dans ce sens, les résultats récemment obtenus dans la même thématique par des collègues chinois montrent une étroite corrélation entre la production de latex et l'accumulation des transcrits du même transporteur (*HbSUT1B*) chez des clones différents de PB260 et PB217. Cette démarche pourrait aussi être complétée par la cartographie des gènes

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

HbSUT1B, *HbHXT1* et *HbPLT2*, dans le but de vérifier leur co-localisation avec des QTLs (quantitative trait locus) de production déjà identifiés.

Dans un deuxième temps, nous envisageons d'enrichir notre modèle en identifiant tous les acteurs membranaires de l'absorption des sucres solubles et des polyols par les cellules laticifères. Il serait donc pertinent de caractériser d'autres acteurs majeurs de l'absorption des nutriments carbonés comme l'ATPase membranaire et l'invertase pariétale. En effet, il a été démontré par des études biochimiques et électrophysiologiques que l'augmentation des protons dans le cytosol due au co-transporteurs de sucres était régulé par une pompe à protons H+/ATPase (Lacrotte, 1985 ; Bouteau *et al.*, 1999) et que la stimulation ethylénique induisait une activation de cette pompe (Lacrotte, 1991). Cependant, aucune démarche moléculaire n'a été entreprise pour identifier son gène. Aussi, les connaissances acquises sur cette protéine seront très utiles pour compléter notre modèle global d'absorption des solutés par les cellules laticifères. Il en est de même pour l'invertase pariétale, qui permettrait la transformation du saccharose en hexoses pris en charge par HbHXT1. L'identification de ces deux gènes, ainsi que de leur mode de régulation par l'éthylène, les hormones, la blessure, l'exploitation, permettra d'avoir une vision globale du fonctionnement de la membrane des cellules laticifères.

Enfin, pour compléter notre modèle de point de vue académique, nous envisageons d'appréhender les mécanismes moléculaires de régulation des trois gènes candidats, en relation avec la régénération pour *HbSUT1B* et *HbHXT1*, et avec la pression osmotique pour *HbPLT2*. Dans cette optique, nous souhaitons identifier les éléments *cis* de régulation importants sur les promoteurs de ces gènes, en effectuant des transformations stables (hévéa) et/ou transitoires (eucalyptus) avec des constructions contenant les promoteurs entiers ou délaités fusionnés à la GFP. Puis les facteurs de transcriptions responsables de la régulation de ces gènes seront identifiés par la technique du simple hybride. Une fois identifiés et caractérisés, l'utilisation de ces facteurs de transcription en tant que marqueurs moléculaires pourrait être envisagée.

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

Figure 41 : Modèle intégré de la régulation de la production de latex dans les cellules laticifères

Les transporteurs de sucres (*HbSUT1B, HbHXT1*) interviendraient dans la production de latex en régulant le processus de régénération. En effet, le saccharose a un double rôle dans la cellule laticifère : 1) en tant que précurseur de la biosynthèse du caoutchouc et source de carbone du métabolisme cellulaire, il intervient dans ce processus de régénération du latex ; et 2) en tant que molécule osmotiquement active, il intervient dans le maintien de la pression de turgescence des cellules laticifères, indispensable à l'efflux de latex.
Les transporteurs de quebrachitol (*HbPLT2*) interviendraient également dans la production mais en régulant le processus d'écoulement. Le détournement du flux de quebrachitol, soluté compatible, permettrait de réguler la pression osmotique intra-laticifères et les flux d'eau afin de prolonger l'écoulement du latex.

Les flèches indiquent des relations de régulation.
HbPLT2 : *Hevea brasiliensis* Polyols Transporter 2 ; HbSUT1B : *Hevea brasiliensis* Sucrose Transporter 1B ; HbHXT1 : *Hevea brasiliensis* HeXose Transporter 1
AQP : Aquaporine ; IP : invertase pariétale ; JA : acide jasmonique, SA : acide salycilique ; ABA : acide abscissique ; Aux : auxine.

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

Bibliographie

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

Abe H, Urao T, Ito T, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. 2003. *Arabidopsis* AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. *Plant Cell* **15**: 63-78.

Abraham PD, Taylera RS. 1967. Stimulation of latex flow in *Hevea brasiliensis*. *Experimental Agriculture* **3**: 1-12.

Abraham PD, Wycherley PR, Pakianathan SW. 1968. Stimulation of latex flow in *Hevea brasiliensis* of 4-amino-3,5,6-trichloropicolinic acid and 2-chloroethane-phosphonic acid. *Journal of Rubber Research* **20**: 291-305.

Adams, M.A., Richter, A., Hill, A.K. and Colmer, T.D. 2005 Salt tolerance in Eucalyptus spp.: identity and response of putative osmolytes. *Plant Cell and Environment* **28**: 772-787.

Ageorges A, Issalya N, Picaud S, Delrot S, Romieu C. 2000. Identification and functional expression in yeast of a grape berry sucrose carrier. *Plant Physiology and Biochemistry* **38**: 177-185.

Alonso JM, Stepanova AN, Solano R, Wisman E, Ferrari S, Ausubel FM, Ecker JR. 2003. Five components of the ethylene-response pathway identified in a screen for weak ethylene-insensitive mutants in Arabidopsis. *Proc. Natl Acad. Sci.* **100**: 2992-2997.

Aluri S, Büttner M. 2007. Identification and functional expression of the *Arabidopsis thaliana* vacuolar glucose transporter 1 and its role in seed germination and flowering. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 2537-2542.

Alves G, Sauter J, Julien J, Fleurat-Lessard P, Ameglio T, Guilliot A, G GP, Lacointe A. 2001. Plasma membrane H+-ATPase, succinate and isocitrate dehydrogenases activities of vessel-associated cells in walnut trees. *Journal of Plant Physiology* **158**: 1263–1271.

Amalou Z, Bangratz J, Chrestin H. 1992. Ethrel® (ethylene releaser) induced increase in the adenylate pool and transtonoplast pH within latex cells. *Plant Physiology* **98**: 1270-1276.

Amalou Z, Gibrat R, Trouslot P, d'Auzac J. 1994. Solubilization and reconstitution of the Mg2+/2H+ antiporter of the lutoid tonoplast from *Hevea brasiliensis*. *Plant Physiology* **106**: 79-85.

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

Andrews EH, Dickenson PB. 1960. Preliminary electron microscope observations on the ultra-structure of the latex vessels and its contents in young tissues of *Hevea brasiliensis* latex. In *National Rubber Research Conference*. Kuala Lumpur, Malaysia.

Archer BL, Cockbain EG. 1969. Rubber transferase from *Hevea brasiliensis* latex. *Methods Enzymol* **15**: 476-480.

Archer BL, Audley BG. 1987. New aspects of rubber biosynthesis. pp. 181-196.

Arndt SK, Livesley SJ, Merchant A, Bleby TM, Grierson PF. 2008. Quercitol and osmotic adaptation of field-grown *Eucalyptus* under seasonal drought stress. *Plant Cell and Environment* **31**: 915-924.

Atanassova R, Leterrier M, Gaillard C, Agasse A, Sagot E, Coutos-Thevenot P, Delrot S. 2003. Sugar-regulated expression of a putative hexose transport gene in grape. *Plant Physiology* **131**: 326-334.

d'Auzac J. 1964b. Disponibilités en phosphore énergétique, biosynthèse du caoutchouc et productivité de l' *Hevea brasiliensis*. *Comptes Rendues des séances de l'Académie des Sciences* **258**: 5091-5094.

d'Auzac J. 1964a. Mise en evidence de la glycolyse et de ses relations avec la biosynthèse du caoutchouc au sein du latex d' *Hevea brasiliensis*. *Revue Générale des Caoutchoucs et Plastiques* **41**: 1831-1834.

d'Auzac J. 1965a. Etudes de quelques réactions métaboliques liées, au sein du latex d'*Hevea brasiliensis*, à la biogénèse du caoutchouc. Paris.

d'Auzac J. 1965b. Sur quelques relations entre, la composition, l'activité biochimique du latex et la productivité de l'*Hevea brasiliensis*. Paris.

d'Auzac J. 1989a. Factors involved in the stopping of flow after tapping. In: d'Auzac J, Jacob J, Chrestin H eds. *Physiologie of Rubber Tree Latex*. Boca Raton, Floride, USA: CRC Press.

d'Auzac J. 1989b. The hormonal stimulation of latex yield. In: d'Auzac J, Jacob JL, Chrestin H eds. *Physiology of rubber tree latex*. Boca Raton, Floride, USA: CRC Press Inc.

d'Auzac J, Jacob JL. 1969. Regulation of glycolysis in the latex of *Hevea brasiliensis Journal of Rubber Research* **21**: 417-444.

d'Auzac J, Lioret C. 1974. Mise en évidence d'un mécanisme d'accumulation du citrate dans les lutoïdes d'*Hevea brasilensis*. *Physiologie Végétale* **12**: 617-635.

d'Auzac J, Pujarniscle S. 1959. Les glucides de l'Hevea brasiliensis. Etude qualitative. *Revue Générale du Caoutchouc* **36**: 1687-1692.

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

d'Auzac J, Pujarniscle S. 1961. Aperçu sur l'étude des glucides de l'hévéa et sur leur variation. *Revue Générale du Caoutchouc* **38**: 1131-1139.

d'Auzac J, Ribaillier D. 1969. L'ethylène, un nouveau stimulant de la production de latex chez l'*Hevea brasiliensis*. *Compte-rendus de l'Académie des Sciences Série D* **268**: 3046-3049.

d'Auzac J, Crétin H, Martin B, Lioret C. 1982. A plant vacuolar system : the lutoïds from *Hevea brasiliensis* latex. *Physiologie Végétale* **20**: 311-331.

d'Auzac J, Jacob J, Chrestin H. 1989. *Physiology of rubber tree latex. The laticiferous cell and latex - a model of cytoplasm*. Boca Raton, Floride, USA: CRC Press Inc.

Baena-Gonzalez E, Rolland F, Thevelein JM, Sheen J. 2007. A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signalling. *Nature* **448**: 938-U910.

Baptist EDC, Jonge P. 1955. Stimulation of yield in *Hevea brasiliensis*. *Rep. 14th Inst. Hortic. Netherland*: 1428-1436.

Barker L, Kuhn C, Weise A, Schulz A, Gebhardt C, Hirner B, Hellmann H, Schulze W, Ward JM, Frommer WB. 2000. SUT2, a putative sucrose sensor in sieve elements. *Plant Cell* **12**: 1153-1164.

Barnard D. 1965. Enzymic reaction in latex serum of relevance to rubber biosynthesis. In. London: MacLaren and Sons.

Barth I, Meyer S, Sauer N. 2003. PmSUC3: characterization of a SUT2/SUC3-type sucrose transporter from Plantago major. *Plant Cell* **15**: 1375-1385.

Baud S, Wuilleme S, Lemoine R, Kronenberger J, Caboche M, Lepiniec L, Rochat C. 2005. The AtSUC5 sucrose transporter specifically expressed in the endosperm is involved in early seed development in Arabidopsis. *Plant Journal* **43**: 824-836.

Bealing FJ. 1969. Carbohydrate metabolism in *Hevea* latex – availability and utilization of substrates. *Journal of the Rubber Research Institute of Malaysia* **21**: 445–455.

Bealing FJ. 1981. Quebrachitol synthesis in *Hevea brasiliensis*. *Journal of the Rubber Research Institute of Malaysia* **29**: 111-122.

Bernacchia G, Furini A. 2004. Biochemical and molecular responses to water stress in resurrection plants. *Physiologia Plantarum* **121**: 175-181.

Berüter J. 1993. Characterization of the permeability of excised apple tissue for sorbitol. *Journal of Experimental Botany* **44**: 519-528.

Berüter J, Feusi MES. 1995. Comparison of sorbitol transport in excised tissue discs and cortex tissue of intact apple fruit. *Journal of Plant Physiology* **146**: 95-102.

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

Bieleski RL. 1982. Sugar alcohols. In: SpringerVerlag ed. *Encyclopedia of Plant Physiology*. Berlin.

Bolle-Jones EW. 1955. Tentative method of sugar estimation in *Laminae* and application to *Hevea brasiliensis*. *Physiologia Plantarum* **8**: 1-7.

Bouché-Pillon S. 1994. Immunolocalisation de l'ATPase pompe à proton de la membrane plasmique en relation avec la compartimentation des nutriments dans la plante. Université de Poitiers, France.

Bourion V, Lejeune-Henaut I, Munier-Jolain N, Salon C. 2003. Cold acclimation of winter and spring peas: carbon partitioning as affected by light intensity. *European Journal of Agronomy* **19**: 535-548.

Bouteau F, Bousquet U, Lacrotte R, Cornel D, Monestiez M, Rona JP. 1992. Sucrose/H+ and glucose/H+ symports at the plasma membrane of laticiferous cells and protoplasts of *Hevea brasiliensis*. In. *Indian Journal of Natural Rubber Research*.

Bouteau F, Dellis O, Rona JP. 1999. Transient outward K+ currents across the plasma membrane of laticifer from *Hevea brasiliensis*. *FEBS Letters* **458**: 185-187.

Brown MM, Hall JL, Ho LC. 1997. Sugar uptake by protoplasts isolated from tomato fruit tissues during various stages of fruit growth. *Physiologia Plantarum* **101**: 533-539.

Bruce TJA, Matthes MC, Napier JA, Pickett JA. 2007. Stressful "memories" of plants: Evidence and possible mechanisms. *Plant Science* **173**: 603-608.

Bürkle L, Hibberd JM, Quick WP, Kuhn C, Hirner B, Frommer WB. 1998. The H+-sucrose cotransporter NtSUT1 is essential for sugar export from tobacco leaves *Plant Physiology* **118**: 59-68.

Büttner M. 2007. The monosaccharide transporter(-like) gene family in *Arabidopsis*. *FEBS Letters* **581**: 2318-2324.

Büttner M, Sauer N. 2000. Monosaccharide transporters in plants: structure, function and physiology. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* **1465**: 263-274.

Büttner M, Truernit E, Baier K, Scholz-Starke J, Sontheim M, Lauterbach C, Huss VAR, Sauer N. 2000. AtSTP3, a green leaf-specific, low affinity monosaccharide-H+ symporter of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell and Environment* **23**: 175-184.

Buttery BR, Boatman SG. 1966. Manometric measurement of turgor pressures in laticiferous phloem tissues. *Journal of Experimental Botany* **17**: 283-296.

Cakir B, Agasse A, Gaillard C, Saumonneau A, Delrot S, Atanassova R. 2003. A grape ASR protein involved in sugar and abscisic acid signaling. *Plant Cell* **15**: 2165-2180.

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

Campaignolle J, Bouthillon J. 1955. Stimulation par des combinaisons de sulfate de cuivre et de 2,4 D. In *Rapport Annuel de l'Institut de Recherche du Caoutchouc*. Indochine.

Chauhan S, Forsthoefel N, Ran YQ, Quigley F, Nelson DE, Bohnert HJ. 2000. Na+/myo-inositol symporters and Na+/H+-antiport in Mesembryanthemum crystallinum. *Plant Journal* **24**: 511-522.

Chincinska IA, Liesche J, Krügel U, Michalska J, Geigenberger P, Grimm B, Kühn C. 2008. Sucrose transporter StSUT4 from potato affects flowering, tuberization, and shade avoidance response. *Plant Physiology* **146**: 515-528.

Chiou TJ, Bush DR. 1998. Sucrose is a signal molecule in assimilate partitioning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 4784-4788.

Chow KS, Wan KL, Isa MNM, Bahari A, Ta SH, Harikrishna K, Yeang HY. 2007. Insights into rubber biosynthesis from transcriptome analysis of *Hevea brasiliensis* latex. *Journal of Experimental Botany* **58**: 2429-2440.

Chrestin H. 1984. Le compartiment vacuo-lysosomal (les lutoïdes) du latex d'*Hevea brasiliensis*, son rôle dans le maintien de l'homéostasie et dans le processus de sénescence des cellules lactifères. In *Science naturelle*. Montpellier, France: Université sciences et techniques du Languedoc.

Chrestin H, Bangratz J. 1988. Les nucléotides adényliques et la charge énergétique dans le latex d'*Hevea brasiliensis* : caractéristiques clonales, liaisons avec les potentialités de production et la sensibilité aux encoches sèches. Effets de la stimulation à l'Ethrel. In *IRRDB Physiologie et Amélioration de l'Hévéa*. Edited by JC JJeP. Montpellier: IRCA-CIRAD.

Chrestin H, Bangratz J, Dauzac J, Jacob JL. 1984a. Role of the lutoidic tonoplast in the senescence and degeneration of the laticifers of *Hevea brasiliensis*. *Zeitschrift Fur Pflanzenphysiologie* **114**: 261-268.

Chrestin H, Gidrol X, Marin B, Jacob JL, Dauzac J. 1984b. Role of the lutoidic tonoplast in the control of the cytosolic homeostasis within the laticiferous cells of *Hevea*. *Zeitschrift Fur Pflanzenphysiologie* **114**: 269-277.

Chrestin H, Marin B, Jacob JL, d'Auzac J. 1985a. Cooperation of a "Davies type" biochemical pH-stat and the tonoplastic bioosmotic pH-Stat in the regulation of the cytosolic pH of *Hevea* latex. In: Verlag S ed. *Biochemistry and function of vacuolar adenosine triphosphatase in fungi and plants*. Berlin.

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

Chrestin C, Marin B, Jacob JL, d'Auzac J. 1989. Metabolic regulation and homeostasis in the laticiferous cell. In: d'Auzac J, Jacob J, Chrestin H eds. *Physiologie of Rubber Tree Latex*. Boca Raton, Floride, USA: CRC Press.

Cohen JD, Bandurski RS. 1982. Chemistry and physiology of the bound auxins. *Annual Review of Plant Physiology* **33**: 403-430.

Commère J, Eschbach J-M. 1988. The advantages of low intensity upward tapping in Côte d'Ivoire. In: Jacob JL, Prévôt JC eds. *Compte-rendu du Colloque Exploration Physiologie et Amélioration de l' Hévéa*. Montpellier: IRCA-CIRAD.

Conrath U, Beckers GJM, Flors V, Garcia-Agustin P, Jakab G, Mauch F, Newman MA, Pieterse CMJ, Poinssot B, Pozo MJ, Pugin A, Schaffrath U, Ton J, Wendehenne D, Zimmerli L, Mauch-Mani B. 2006. Priming: Getting ready for battle. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **19**: 1062-1071.

Cook AS, Mullen AIM. 1951. The pre-coagulation of latex in wet weather. *Journal of Rubber Research* **13**: 139-145.

Cornish K, Backhaus RA. 1990. Rubber transferase activity in rubber particles of Guayule. *Phytochemistry* **29**: 3809-3813.

Coupé M, Lambert C. 1977. Absorption of citrate bt the lutoids of latex and rubber production by *Hevea brasiliensis*. *Phytochemistry* **16**: 455-458.

Crétin H. 1982. The proton gradient across the vacuo-lysosomal membrane of lutoïds from latex of *Hevea brasiliensis*. Further evidence for a proton-translocating ATPase on the vacuo-lysosomal membrane of intact lutoïds. *Journal of Membran Biology* **65**: 175-184.

Crétin H. 1983. A transtonoplastic efflux of protons coupled with an electron transport system (the NADH-cytochrome c reductase) in the membrane of the vacuolysosomes from the latex of *Hevea brasiliensis*. *Comptes Rendus des Séances de l'Académie des Sciences, III (Sciences de la Vie)* **296**: 137-142.

Crétin H, Bangratz J. 1983. Efflux transtonoplastique de protons lors du fonctionnement d'un système transporteur d'électrons (la NADH-cytochrome_*c*_réductase) membranaire des vacuolysosomes du latex d'*Hevea brasiliensis*. *Revue Générale des Caoutchoucs et Plastiques* **603**: 111-115.

Daie J. 1986. Kinetics of sugar transport in isolated vascular bundles and phloem tissue of celery. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **111**: 216-220.

Daie, J. 1988 Mechanism of Drought-Induced Alterations in Assimilate Partitioning and Transport in Crops. *Crc Critical Reviews in Plant Sciences* **7**: 117-137.

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

Davies WJ, Rodriguez JL, Fiscus EL. 1982. Stomatal behavior and water movement through roots of wheat plants treated with abscisic acid. *Plant Cell and Environment* **5**: 485-493.

Davies C, Wolf T, Robinson SP. 1999. Three putative sucrose transporters are differentially expressed in grapevine tissues. *Plant Science* **147**: 93-100.

Decourteix M, Alves G, Brunel N, Ameglio T, Guilliot A, Lemoine R, Petel G, Sakr S. 2006. JrSUT1, a putative xylem sucrose transporter, could mediate sucrose influx into xylem parenchyma cells and be up-regulated by freeze-thaw cycles over the autumn-winter period in walnut tree (*Juglans regia* L.). *Plant, Cell and Environment* **29**: 36-47.

Decourteix M, Alves G, Bonhomme M, Peuch M, Ben Baaziz K, Brunel N, Guilliot A, Rageau R, Ameglio T, Petel G, Sakr S. 2008. Sucrose (JrSUT1) and hexose (JrHT1 and JrHT2) transporters in walnut xylem parenchyma cells: their potential role in early events of growth resumption. *Tree Physiology* **28**: 215-224.

Delrot S, Atanassova R, Maurousset L. 2000. Regulation of sugar, amino acid and peptide plant membrane transporters. *Biochimica et Biophysica Acta, Biomembranes* **1465**: 281-306.

Delrot, S., Atanassova, R., Gomes, E. and Coutos-Thevenot, P. 2001 Plasma membrane transporters: a machinery for uptake of organic solutes and stress resistance. *Plant Sci.* **161**: 391-404.

Dennis MS, Light DR. 1989. Rubber Elongation Factor from *Hevea brasiliensis*. Identification, characterization and role in rubber biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry* **264**: 18608-18617.

Drew ME, Langford CK, Klamo EM, Russell DG, Kavanaugh MP, Landfear SM. 1995. Functional expression of a *myo*-inositol/H+ symporter from *Leishmania donovani*. *Molecular and Cellular Biology* **15**: 5508-5515.

Duffy C, Kane MT. 1996. Investigation of the role of inositol and the phosphatidylinositol signal transduction system in mouse embryonic stem cells. *Journal of Reproduction and Fertility* **108**: 87-93.

Dusotoit-Coucaud A, Brunel N, Kongsawadworakul P, Viboonjun U, Julien J-L, Chrestin H, Sakr S. 2009b. Sugar importation into laticiferous cells of Hevea brasiliensis, in relation to ethylene stimulation of latex yield *Annals of botany* **in press**.

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

Ehness R, Roitsch T. 1997. Co-ordinated induction of mRNAs for extracellular invertase and a glucose transporter in *Chenopodium rubrum* by cytokinins. *Plant Journal* **11**: 539-548.

Eisenbarth DA, Weig AR. 2005. Sucrose carrier RcSCR1 is involved in sucrose retrieval, but not in sucrose unloading in growing hypocotyls of Ricinus communis L. *Plant Biology* **7**(1): 98-103.

Endler A, Meyer S, Schelbert S, Schneider T, Weschke W, Peters SW, Keller F, Baginsky S, Martinoia E, Schmidt UG. 2006. Identification of a vacuolar sucrose transporter in barley and *Arabidopsis* mesophyll cells by a tonoplast proteomic approach. *Plant Physiology* **141**: 196-207.

Eschbach JM, Banchi Y. 1985. Advantages of Ethrel stimulation in association with reduced tapping intensity in the Ivory Coast. *Planter* **61**: 555-567.

Eschbach JM, Roussel D, Van de Sype H, Jacob JL, d'Auzac J. 1984. Relationships between yield and clonal physiological characteristics of latex from *Hevea brasiliensis*. *Physiologie Végétale* **22**: 294-304.

Eschbach J-M, Tupy J, Lacrotte R. 1986. Photosynthate allocation and productivity of latex vessels in *Hevea brasiliensis*. *Biologia Plantarum* **28**: 321-328.

Eulgem T, Rushton PJ, Schmelzer E, Hahlbrock K, Somssich IE. 1999. Early nuclear events in plant defence signalling: rapid gene activation by WRKY transcription factors. *Embo Journal* **18**: 4689-4699.

Eulgem T, Somssich IE. 2007. Networks of WRKY transcription factors in defense signaling. *Current Opinion in Plant Biology* **10**: 366-371.

Everard JD, Gucci R, Kann SC, Flore JA, Loescher WH. 1994. Gas exchange and carbon partitioning in the leaves of celery (*Apium graveolens* L) at various levels of root zone salinity. *Plant Physiology* **106**: 281-292.

Fan, R.C., Peng, C.C., Xu, Y.H., Wang, X.F., Li, Y., Shang, Y., Du, S.Y., Zhao, R., Zhang, X.Y., Zhang, L.Y. and Zhang, D.P. 2009 Apple Sucrose Transporter SUT1 and Sorbitol Transporter SOT6 Interact with Cytochrome b5 to Regulate Their Affinity for Substrate Sugars. *Plant Physiology* **150**: 1880-1901.

de Faÿ E, Jacob JL. 1989. Anatomical organization of the laticiferous system in the bark. In: d'Auzac J, Jacob J, Chrestin H eds. *Physiologie of Rubber Tree Latex*. Boca Raton, Floride, USA: CRC Press.

de Faÿ E, Hébant C, Jacob JL. 1989. Cytology and cytochemistry of the laticiferous system. In: Press C ed. *Physiology of Rubber Tree Latex*. Boca Raton, Floride, USA, 15-29.

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

Fehlberg V, Vieweg MF, Dohmann EMN, Hohnjec N, Puhler A, Perlick AM, Kuster H. 2005. The promoter of the leghaemoglobin gene VfLb29: functional analysis and identification of modules necessary for its activation in the infected cells of root nodules and in the arbuscule-containing cells of mycorrhizal roots. *Journal of Experimental Botany* **56**: 799-806.

Fellman JK, Loescher WH. 1987. Comparative studies of sucrose and mannitol utilization in celery (*Apium graveolens*). *Physiologia Plantarum* **69**: 337-341.

Filichkin SA, Leonard JM, Monteros A, Liu PP, Nonogaki H. 2004. A novel endo-beta-mannanase associated with anther and gene in tomato LeMAN5 is pollen development. *Plant Physiology* **134**: 1080-1087.

Fillion L, Ageorges A, Picaud S, Coutos-Thevenot P, Lemoine R, Romieu C, Delrot S. 1999. Cloning and expression of a hexose transporter gene expressed during the ripening of grape berry. *Plant Physiology* **120**: 1083-1093.

Flora LL, Madore MA. 1993. Stachyose and mannitol transport in olive (*Olea europaea* L). *Planta* **189**: 484-490.

Flora LL, Madore MA. 1996. Significance of minor-vein anatomy to carbohydrate transport. *Planta* **198**: 171-178.

Francis D, Halford NG. 2006. Nutrient sensing in plant meristems. *Plant Molecular Biology* **60**: 981-993.

Frey-Wissling A. 1932. Studies on the dilution reaction and the mouvement of the latex of *Hevea brasiliensis* during tapping. *Arch. Rubbercult.* **16**: 285-327.

Gahrtz M, Stolz J, Sauer N. 1994. A Phloem specific sucrose-H+ symporter from *Plantago major* L supports the model of apoplastic phloem loading. *Plant Journal* **6**: 697-706.

Gao ZF, Maurousset L, Lemoine R, Yoo SD, van Nocker S, Loescher W. 2003. Cloning, expression, and characterization of sorbitol transporters from developing sour cherry fruit and leaf sink tissues. *Plant Physiology* **131**: 1566-1575.

Gear ML, McPhillips ML, Patrick JW, McCurdy DW. 2000. Hexose transporters of tomato: molecular cloning, expression analysis and functional characterization. *Plant Molecular Biology* **44**: 687-697.

Gidrol X, Chrestin H, Tan HL, Kush A. 1994. Hevein, a lectin-like protein from *Hevea brasiliensis* (Rubber Tree) is involved in the coagulation of latex. *Journal of Biological Chemistry* **269**: 9278-9283.

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

Gohet E. 1996. La production de latex par *Hevea brasiliensis*, relations avec la croissance. Influence de différents facteurs : origine clonale, stimulation hormonale, réserves hydrocarbonées. In *Montpellier*, pp. 343. Montpellier: Université Montpellier II.

Gohet E, Lacrotte R, Obouayeba S, Commère J. 1991. Tapping systems recommended in West Africa. In *Rubber Growers' Conference*. Edited by Malaysia RRIo. Kuala Lumpur, Malaysia.

Gohet E, Prevot JC, Eschbach JM, Clement A, Jacob JL. 1996. Hevea latex production, relationship with tree growth, influence of clonal origin and Ethrel stimulation. In *Symposium on physiological and molecular aspects of the breeding of Hevea brasiliensis, Penang, Malaysia, 6-7 November 1995.*, pp. 200-210: International Rubber Research and Development Board.

Gohet E, Chanuma P, Lacote R, Obouayeba S, Dian K, Clement-Demange A, Kurnia D, Eschbach JM. 2003. Latex clonal typology of *Hevea brasiliensis*. Physiological modelling of yield potential and clonal response to Ethephon stimulation. In *IRRDB Workshop on exploitation technology*. Kottayam, India.

Gomez JB. 1976. Comparative ultracytology of young and mature latex vessels in *Hevea brasiliensis*. In *International Rubber Conference*. Edited by *Malaysia RRI*. Kuala Lumpur, Malaysia.

Gomez JB. 1977. Demonstration of latex coagulation in bark extracts of *Hevea* and their possible role in latex flow. *Journal of Rubber Research* **25**: 109-119.

Gomez JB. 1983. Physiology of latex (rubber) production. In *Malaysian Rubber Research and Development Board*. Kuala Lumpur, Malaysia.

Gomez JB, Southorn WA. 1969. Studies in lutoid membrane ultrastructure. *Journal of Rubber Research* **21**: 389-406.

Gomez JB, Moir GFJ. 1979. The ultracytology of latex vessels in *Hevea brasiliensis* In *Malaysian Rubber Research Development Board*. Edited by Malaysia RRI. Kuala Lumpur.

Guy CL, Huber JLA, Huber SC. 1992. Sucrose phosphate synthase and sucrose accumulation at low temperature. *Plant Physiology* **100**: 502-508.

Hackel A, Schauer N, Carrari F, Fernie AR, Grimm B, Kuhn C. 2006. Sucrose transporter LeSUT1 and LeSUT2 inhibition affects tomato fruit development in different ways. *Plant Journal* **45**: 180-192.

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

Häfliger B, Kindhauser E, Keller F. 1999. Metabolism of D-glycero-D-manno-heptitol volemitol, in polyanthus. Discovery of a novel ketose reductase. *Plant Physiology* **119**: 191-197.

Hanower P, Brzozowska J, Lioret C. 1976. Study of coagulation of *Hevea brasiliensis* latex .1. Factors acting on coagulation. *Physiologie Végétale* **14**: 677-693.

Haritatos E, Medville R, Turgeon R. 2000. Minor vein structure and sugar transport in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **211**: 105-111.

Harms K, Wöhner RV, Schulz B, Frommer WB. 1994. Isolation and characterization of P-type H(+)-ATPase genes from potato. *FEBS Letters* **26**: 979-988.

Harrison MJ. 1996. A sugar transporter from *Medicago truncatula*: Altered expression pattern in roots during vesicular-arbuscular (VA) mycorrhizal associations. *Plant Journal* **9**: 491-503.

Hartmann U, Sagasser M, Mehrtens F, Stracke R, Weisshaar B. 2005. Differential combinatorial interactions of cis-acting elements recognized by R2R3-MYB, BZIP, and BHLH factors control light-responsive and tissue-specific activation of phenylpropanoid biosynthesis genes. *Plant Molecular Biology* **57**: 155-171.

Hayes MA, Davies C, Dry IB. 2007. Isolation, functional characterization, and expression analysis of grapevine (*Vitis vinifera* L.) hexose transporters: differential roles in sink and source tissues. *Journal of Experimental Botany* **58**: 1985-1997.

Hébant C. 1981. Ontogénie des laticifères du système primaire de l'*Hevea brasiliensis*, une étude ultra structurale et cytochimique. *Canadian Journal of Botany* **59**: 974-985.

Hébant C, Faÿ ED. 1980. Functional organization of the bark of *Hevea brasiliensis* (rubber tree) : a structural and histoenzymological study. *pflanzenphysiology*.

Hepper CM, Audley BG. 1969. The biosynthesis of rubber from hydroxy-methyl-glutaryl coenzyme A in *Hevea brasiliensis* latex. *Biochemistry Journal* **114**: 379.

Hirose T, Imaizumi N, Scofield GN, Furbank RT, Ohsugi R. 1997. cDNA cloning and tissue specific expression of a gene for sucrose transporter from rice (*Oryza sativa* L.). *Plant and Cell Physiology* **38**: 1389-1396.

Ho LC. 1988. Metabolism and compartmentation of imported sugars in sink organs in relation to sink strength. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **39**: 355-378.

Hoekstra FA, Golovina EA, Buitink J. 2001. Mechanisms of plant desication tolerance. *Trends in Plant Science* **6**: 431-438.

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

Iraqui I, Vissers S, Bernard F, Craene JOd, Boles E, Urrestarazu A, Andre B. 1999. Amino acid signaling in *Saccharomyces cerevisiae*: a permease-like sensor of external amino acids and F-Box protein Grr1p are required for transcriptional induction of the AGP1 gene, which encodes a broad-specificity amino acid permease. *Molecular Cell Biology* **19**: 989-1001.

Itzhaki H, Maxson JM, Woodson WR. 1994. An ethylene responsive enhancer element is involved in the senescence-related expression of the carnation glutathione-S-transferase (Gsti) gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**: 8925-8929.

Jacob JL. 1970a. Particularités de la glycolyse et de sa régulation au sein du latex d'*Hevea brasiliensis*. Thèse. Orsay: Faculté des sciences.

Jacob JL. 1970b. Les activités enzymatiques du latex d' *Hevea brasiliensis* différentes de celles de la glycolyse. Thèse. Orsay: Université de Paris.

Jacob JL. 1970c. Particularité de la gycolyse et de sa régulation au sein du latex d' *Hevea brasiliensis*. *Physiologie Végétale* **3**: 395-411.

Jacob JL, d'Auzac J. 1972. La glyceraldéhyde-3-phosphate acide lutoïdique de latex d'*Hevea brasiliensis*, comparaison avec son homologue phosphorylante. *European Journal of Biochemistry* **31**: 255-265.

Jacob JL, Prévôt JC, Primot L. 1978. Phosphoenolpyruvate carboxylase and pH in *Hevea brasiliensis* latex. In *International Rubber Research Development Board Symposium*. Kuala Lumpur, Malaisie.

Jacob JL, Sontag N. 1974. Purification and study of acid phosphatase of *Hevea brasiliensis* latex. *Biochimie* **56**: 1315-1322.

Jacob JL, Primot L, Prevôt JC. 1979. Phosphoenolpyruvate carboxylase of *Hevea brasiliensis*: purification and characteristics. *Physiologie Végétale* **17**: 501-516.

Jacob J-L, Prévôt J-C, Primot L. 1981. La pyruvate kinase du latex d'Hévéa. *Revue Générale des Caoutchoucs et Plastiques* **612**: 89-92.

Jacob J-L, Prévôt J-C, D'Auzac J. 1982. Physiological activators of invertase from *Hevea brasiliensis* latex. *Phytochemistry* **21**: 851-853.

Jacob JL, Prévôt JC, D'Auzac J. 1983. Physiological régulation of phosphoenolpyruvate carboxylase from a non-chlorophyllian system: the *Hevea* latex. *Physiologie Végétale* **31**: 1013-1019.

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

Jacob JL, Eschbach JM, Prévôt JL, Roussel D, Lacrotte R, Chrestin H. 1985. Physiological basis for latex diagnosis of the functioning of the laticiferous system in rubber trees. In *International Rubber Conference*. Kuala Lumpur.

Jacob JL, Serres E, Prévôt J-C, Lacrotte R, Clément-Vidal A, Eschbach J-M, d'Auzac J. 1988. Mise au point du diagnostic latex. *Agritrop.* **12**: 97-118.

Jacob JL, Prévôt JC, Kekwick RGO. 1989a. General metabolism of *hevea brasiliensis* latex (with exception of isoprenic anabolism). In: d'Auzac J, Jacob JL, Chrestin H eds. *Physiology of rubber tree latex*. Boca Raton, Floride, USA: CRC Press Inc.

Jacob JL, Prévôt JC, Roussel D, Lacrotte R, Serres E, d'Auzac J, Eschbach JM, Omont H. 1989b. Yield limiting factors, latex physiological parameters, latex diagnosis and clonal typology. In: d'Auzac J, Jacob JL, Chrestin H eds. *Physiology of rubber tree latex*. Boca Raton, Floride, USA: CRC Press Inc.

Jacob, J.L., Prevot, J.C., Clementvidal, A. and Dauzac, J. 1989 Inorganic Pyrophosphate Metabolism in Hevea-Brasiliensis Latex - Characteristics of Cytosolic Alkaline Inorganic Pyrophosphatase. *Plant Physiology and Biochemistry* **27**: 355-364.

de Faÿ E. 1984. Histologie comparée des écorces saines et pathologiques (maladie des encoches sèches) de l' *Hevea brasiliensis* pp. 75. Montpellier: Université des Sciences et Techniques du Languedoc.

Jacob JL, d'Auzac J, Prévôt JC, Sérier JB. 1995a. Une usine à caoutchouc naturel : l'Hévéa. *La Recherche* **276**: 538-545.

Jacob JL, Prévôt JC, Lacrotte R, Eschbach JM. 1995c. Le diagnostic latex. *Plantations, Recherche, Développement* **2**: 34-37.

Jacob JL, Prevôt JC, Lacrotte R, Clement A, Serres E, Gohet E. 1995d. Clonal typology of laticifer functioning in *Hevea brasiliensis*. *Plantations, Recherche, Développement* **2**: 43-49.

Jennings, D.B., Ehrenshaft, M., Pharr, D.M. and Williamson, J.D. 1998 Roles for mannitol and mannitol dehydrogenase in active oxygen-mediated plant defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 15129-15133.

Jonge AWKd. 1906. *Recueil des travaux chimiques des Pays-bas* **25**: 48.

Joshi CP. 1987. Putative polyadenylation signals in nuclear genes of higher plants - a compilation and analysis. *Nucleic Acids Research* **15**: 9627-9640.

Juchaux-Cachau M, Landouar-Arsivaud L, Pichaut JP, Campion C, Porcheron B, Jeauffre J, Noiraud-Romy N, Simoneau P, Maurousset L, Lemoine R. 2007.

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

Characterization of AgMaT2, a plasma membrane mannitol transporter from celery, expressed in phloem cells, including phloem parenchyma cells. *Plant Physiology* **145**: 62-74.

Juergensen K, Scholz-Starke J, Sauer N, Hess P, Bel AJK, Grundler FM. 2003. The companion cell-specific *Arabidopsis* disaccharide carrier AtSUC2 is expressed in nematode-induced syncytia. *Plant Physiology* **131**: 61-69.

Kandler O, Hopf H. 1984. Biosynthesis of oligosaccharides in vascular plants. In: Lewis D ed. *Storage Carbohydrates in Vascular Plants*. Cambridge, UK: Cambridge University Press.

Kanter U, Usadel B, Guerineau F, Li Y, Pauly M, Tenhaken R. 2005. The inositol oxygenase gene family of *Arabidopsis* is involved in the biosynthesis of nucleotide sugar precursors for cell-wall matrix polysaccharides. *Planta* **221**: 243-254.

Keller F, Matile P. 1989. Storage of sugars and mannitol in petioles of celery leaves. *New Phytologist* **113**: 291-299.

Klepek YS, Geiger D, Stadler R, Klebl F, Landouar-Arsivaud L, Lemoine R, Hedrich R, Sauer N. 2005. Arabidopsis POLYOL TRANSPORTER5, a new member of the monosaccharide transporter-like superfamily, mediates H+-symport of numerous substrates, including myo-inositol, glycerol, and ribose. *Plant Cell* **17**: 204-218.

Knop C, Voitsekhovskaja O, Lohaus G. 2001. Sucrose transporters in two members of the Scrophulariaceae with different types of transport sugar. *Planta* **213**: 80-91.

Ko J, Chow K, Han K. 2003. Transcriptome analysis reveals novel features of the molecular events occurring in the laticifers of *Hevea brasiliensis* (para rubber tree). *Plant Molecular Biology* **53**: 479-492.

Krügel U, Veenhoff LM, Langbein J, Wiederhold E, Liesche J, Friedrich T, Grimm B, Martinoia E, Poolman B, Kuhn C. 2008. Transport and sorting of the *Solanum tuberosum* sucrose transporter SUT1 is affected by posttranslational modification. *Plant Cell* **20**: 2497-2513.

Kühn C, Franceschi VR, Schulz A, Lemoine R, Frommer WB. 1997. Macromolecular trafficking indicated by localization and turnover of sucrose transporters in enucleate sieve elements. *Science* **275**: 1298-1300.

Lacrotte R. 1991. Relationship between the sucroses content of the rubber latex and the production : approach of the mechanisms involved during the saccharose loading of

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

the laticifers of *Hevea brasiliensis*. pp. 266 Montpellier (France): Université de Montpellier 2

Lacrotte R, Sype HVd, Chrestin H. 1985. Influence de l'éthylène sur l'utilisation du saccharose exogène par les laticifères d'*Hevea brasiliensis*. Proposition d'un mécanisme d'action. *Physiologie Végétale* **23**: 187-198.

Lalonde S, Tegeder M, Throne-Holst M, Frommer WB, Patrick JW. 2003. Phloem loading and unloading of sugars and amino acids. *Plant Cell and Environment* **26**: 37-56.

Lee BH, Henderson DA, Zhu JK. 2005. The Arabidopsis cold-responsive transcriptome and its regulation by ICE1. *Plant Cell* **17**: 3155-3175.

Lehle L. 1990. Phosphatidyl inositol metabolism and its role in signal transduction in growing plants. *Plant Molecular Biology* **15**: 647-658.

Lemoine R. 2000. Sucrose transporters in plants: update on function and structure. *Biochimica et Biophysica Acta, Biomembranes* **1465**: 246-262.

Lemoine R, Burkle L, Barker L, Sakr S, Kuhn C, Regnacq M, Gaillard C, Delrot S, Frommer WB. 1999. Identification of a pollen-specific sucrose transporter-like protein NtSUT3 from tobacco. *FEBS Letters* **454**: 325-330.

Leterrier M, Atanassova R, Laquitaine L, Gaillard C, Coutos-Thevenot P, Delrot S. 2003. Expression of a putative grapevine hexose transporter in tobacco alters morphogenesis and assimilate partitioning. *Journal of Experimental Botany* **54**: 1193-1204.

Lewis DH. 1984. Sugar alcohols (polyols) in fungi and green plants.1. Distribution, physiology and metabolism. *Current Contents in Agriculture Biology & Environmental Sciences*: 16-16.

Lichtenthaler HK. 1999. The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **50**: 47-65.

Light DR, Dennis MS. 1989. Purification of a prenyltransferase that elongates *cis*-polyisoprene rubber from the latex of *Hevea brasiliensis*. *Journal of Biological Chemistry* **264**: 18589-18597.

Lim C, Southorn W, Gomez J, Yip E. 1969. Electrophysiological phenomena in *Hevea brasiliensis*. *Journal of Rubber Research* **21**.

Lingle SE. 1989. Evidence for the uptake of sucrose intact into sugarcane internodes. *Plant Physiology* **90**: 6-8.

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

Loescher WH, Everard JD. 1996. Sugar alcohol metabolism in sinks and sources. In: Zamski E. SAA ed. *Photoassimilate Distribution in Plants and Crops*. New York.

Loescher WH, Tyson RH, Everard JD, Redgwell RJ, Bieleski RL. 1992. Mannitol synthesis in higher plants - Evidence for the role and characterization of a NADPH-dependent mannose 6-phosphate reductase. *Plant Physiology* **98**: 1396-1402.

Loewus FA, Murthy PPN. 2000. *Myo*-inositol metabolism in plants. *Plant Science* **150**: 1-19.

Lorence A, Chevone BI, Mendes P, Nessler CL. 2004. *Myo*-inositol oxygenase offers a possible entry point into plant ascorbate biosynthesis. *Plant Physiology* **134**: 1200-1205.

Low FC. 1978. Distribution and concentration of major soluble carbohydrates in *Hevea* Latex, the effects of ethephon stimulation and the possible role of these carbohydrates in latex flow. *Journal of the Rubber Research Institute of Malaysia* **26**: 21-32.

Low FC, Gomez JB. 1982. Carbohydrate status of exploited hevea.1. the effect of different exploitation systems on the concentration of the major soluble carbohydrates in latex. *Journal of the Rubber Research Institute of Malaysia* **30**: 1-18.

Ludwig A, Stolz J, Sauer N. 2000. Plant sucrose-H+ symporters mediate the transport of vitamin H. *Plant Journal* **24**: 503-509.

Lynen F. 1969. Biochemical problems of rubber synthesis. *Journal of Rubber Research Institute of Malaya* **21**: 389-406.

Marger MD, Saier MH. 1993. A major superfamily of transmembranes facilitators that catalyse uniport, symport and antiport *Trends in biochemical sciences* **18**: 13-20.

Marin B. 1981. Le fonctionnement du transporteur tonoplastique du citrate du latex d'*Hevea brasiliensis*. Relation avec l'actvité adénosine triphosphatase membranaire. In *Science Naturelle*. Université Montpellier II.

Matsukura C, Saitoh T, Hirose T, Ohsugi R, Perata P, Yamaguchi J. 2000. Sugar uptake and transport in rice embryo. Expression of companion cell-specific sucrose transporter (OsSUT1) induced by sugar and light. *Plant Physiology* **124**: 85-93.

Maurel, K., Sakr, S., Gerbe, F., Guilliot, A., Bonhomme, M., Rageau, R. and Petel, G. 2004 Sorbitol uptake is regulated by glucose through the hexokinase pathway in vegetative peach-tree buds. *Journal of Experimental Botany* **55**: 879-888.

Merchant, A., Tausz, M., Arndt, S.K. and Adams, M.A. 2006 Cyclitols and carbohydrates in leaves and roots of 13 Eucalyptus species suggest contrasting physiological responses to water deficit. *Plant Cell and Environment* **29**: 2017-2029.

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

Miyazaki S, Rice M, Quigley F, Bohnert HJ. 2003. Expression of plant inositol transporters in yeast. *Plant Science* **166**: 245-252.

Moing A, Langlois N, Svanella L, Zanetto A, Gaudillere JP. 1997. Variability in sorbitol: Sucrose ratio in mature leaves of different *Prunus* species. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **122**: 83-90.

Montgomery J, Goldman S, Deikman J, Margossian L, Fischer RL. 1993. Identification of an ethylene-responsive region in the promoter of a fruit ripening gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**: 5939-5943.

Moore B, Zhou L, Rolland F, Hall Q, Cheng WH, Liu YX, Hwang I, Jones T, Sheen J. 2003. Role of the Arabidopsis glucose sensor HXK1 in nutrient, light, and hormonal signaling. *Science* **300**: 332-336.

Moreau F, Jacob JL, Dupont J, Lance C. 1975. Electron transport in the membrane of lutoids from the latex of *Hevea brasiliensis*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **396**: 116-124.

Münch E. 1929. *Die stoffbewegunen in der pflanze*. Iéna, Allemagne.

Nielsen TH, Deiting U, Stitt M. 1997. A beta-amylase in potato tubers is induced by storage at low temperature. *Plant Physiology* **113**: 503-510.

Nishiuchi T, Shinshi H, Suzuki K. 2004. Rapid and transient activation of transcription of the ERF3 gene by wounding in tobacco leaves - Possible involvement of NtWRKYs and autorepression. *Journal of Biological Chemistry* **279**: 55355-55361.

Noiraud N, Delrot S, Lemoine R. 2000. The sucrose transporter of celery. Identification and expression during salt stress. *Plant Physiology* **122**: 1447-1455.

Noiraud N, Maurousset L, Lemoine R. 2001a. Identification of a mannitol transporter, AgMAT1, in celery phloem. *Plant Cell* **13**: 695-705.

Noiraud N, Maurousset L, Lemoine R. 2001b. Transport of polyols in higher plants. *Plant Physiology and Biochemistry* **39**: 717-728.

Norholm MHH, Nour-Eldin HH, Brodersen P, Mundy J, Halkier BA. 2006. Expression of the *Arabidopsis* high-affinity hexose transporter STP13 correlates with programmed cell death. *FEBS Letters* **580**: 2381-2387.

Opekarová M, Caspari T, Tanner W. 1994. The Hup1 gene product of *Chlorella kessleri* H+/glucose symport studied in vitro. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* **1194**: 149-154.

Özcan S, Dover J, Rosenwald AG, Wolfl S, Johnston M. 1996. Two glucose transporters in *Saccharomyces cerevisiae* are glucose sensors that generate a signal for induction of

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**: 12428-12432.

de Paepe A, Vuylsteke M, Van Hummelen P, Zabeau M, Van Der Straeten D. 2004. Transcriptional profiling by cDNA-AFLP and microarray analysis reveals novel insights into the early response to ethylene in Arabidopsis. *Plant Journal* **39**(4): 537-559.

Pakianathan S, Boatman S, Taysum D. 1966. Particle agreagation following dilution of *Hevea* latex : a possible mechanism for the closure of latex vessels after tapping. *Journal of Rubber Research* **19**: 259-271.

Pakianathan SW. 1976. Physiology of latex flow and water relations [of rubber trees]. In *Rubber Research Institute of Malaysia Short Course on Tapping, Tapping Systems and Yield Stimulation*. Kuala Lumpur, Malaysia.

Pharr DM, Stoop JMH, Williamson JD, Feusi MES, Massel MO, Conkling MA. 1995. The dual role of mannitol as osmoprotectant and photoassimilate in celery. *Hortscience* **30**: 1182-1188.

Pickard WF. 2008. Laticifers and secretory ducts: two other tube systems in plants. *New Phytologist* **177**: 877-887.

Premakumari D, Sherief PM, Sethuraj MR. 1980. Lutoid stability and rubber particle stability as factors influencing yield during drought in rubber. *Journal of Plantation Crops* **8**: 43-47.

Prévôt JC, Jacob JL, Lacrotte R, Vidal A, Serres E, Eschbach JM, Gigault J. 1986. Physiological parameters of latex from *Hevea brasiliensis.* Their use in the study of the laticiferous system. Typology of functionning production metabolism. Effects of stimulation. In *International Meeting of Physiology Explotation International Rubber Research Development Board*. Hainan, Chine.

Primot. 1977a. Saignée, microsaignée et productivité. In *Travaux et Documents de l'Orstom,* pp. 79-82. Edited by ORSTOM. Montpellier, France.

Primot L. 1977b. L'inverstase du latex d'*Hevea brasiliensis* In: ORSTOM ed. *Physiologie du Latex*. Montpellier, France: travaux et documents de l'ORSTOM.

Priya P, Venkatachalam P, Thulaseedharan A. 2006. Molecular cloning and characterization of the rubber elongation factor gene and its promoter sequence from rubber tree (Hevea brasiliensis): A gene involved in rubber biosynthesis. *Plant Science* **171**: 470-480.

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

Quirino BF, Reiter WD, Amasino RD. 2001. One of two tandem *Arabidopsis* genes homologous to monosaccharide transporters is senescence-associated. *Plant Molecular Biology* **46**: 447-457.

Raboy V. 2003. *Myo*-Inositol-1,2,3,4,5,6-hexakisphosphate. *Phytochemistry* **64**: 1033-1043.

Ramsperger-Gleixner M, Geiger D, Hedrich R, Sauer N. 2004. Differential expression of sucrose transporter and polyol transporter genes during maturation of common plantain companion cells. *Plant Physiology* **134**: 147-160.

Ransom-Hodgkins WD, Vaughn MW, Bush DR. 2003. Protein phosphorylation plays a key role in sucrose-mediated transcriptional regulation of a phloem-specific proton-sucrose symporter. *Planta* **217**: 483-489.

Rawat, R., Xu, Z.F., Yao, K.M. and Chye, M.L. 2005 Identification of cis-elements for ethylene and circadian regulation of the Solanum melongena gene encoding cysteine proteinase. *Plant Molecular Biology* **57**: 629-643.

Reinders A, Panshyshyn JA, Ward JW. 2005. Analysis of transport activity of *Arabidopsis* sugar alcohol permease homolog AtPLT5. *Journal of Biological Chemistry* **280**: 1594-1602.

Reinders A, Sivitz AB, Starker CG, Gantt JS, Ward JM. 2008. Functional analysis of *LjSUT4*, a vacuolar sucrose transporter from Lotus japonicus. *Plant Molecular Biology* **68**: 289-299.

Reyes JC, Hennig L, Gruissem W. 2002. Chromatin-remodeling and memory factors. New regulators of plant development. *Plant Physiology* **130**: 1090-1101.

Reyes JC, Muro-Pastor MI, Florencio FJ. 2004. The GATA family of transcription factors in *Arabidopsis* and rice. *Plant Physiology* **134**: 1718-1732.

Ribaillier D. 1972. Quelques aspects du rôle des lutoïdes dans la physiologie de l'écoulement du latex d'*Hevea brasiliensis*. Action de produits libérant de l'éthylène. In *Sciences Naturelles*. Abidjan, Côte d'Ivoire: Université d'Abidjan.

Riesmeier JW, Willmitzer L, Frommer WB. 1992. Isolation and characterization of a sucrose carrier cDNA from spinach by functional expression in yeast. *Embo Journal* **11**: 4705-4713.

Riesmeier JW, Hirner B, Frommer WB. 1993. Potato sucrose transporter expression in minor veins indicates a role in phloem loading. *Plant Cell* **5**: 1591-1598.

Robinson KS, Lai K, Cannon TA, McGraw P. 1996. Inositol transport in *Saccharomyces cerevisiae* is regulated by transcriptional and degradative endocytic mechanisms

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

during the growth cycle that are distinct from inositol-induced regulation. *Molecular Biology of the Cell* **7**: 81-89.

Robl I, Graßl R, Tanner W, Opekarová M. 2000. Properties of a reconstituted eukaryotic hexose/proton symporter solubilized by structurally related non-ionic detergents: specific requirement of phosphatidylcholine for permease stability. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1463**: 407-418.

Roblin G, Sakr S, Bonmort J, Delrot S. 1998. Regulation of a plant plasma membrane sucrose transporter by phosphorylation. *FEBS Letters* **424**: 165-168.

Rodriguez-Concepcion M, Boronat A. 2002. Elucidation of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids. A metabolic milestone achieved through genomics. *Plant Physiology* **130**: 1079-1089.

Rolland F, Winderickx J, Thevelein JM. 2001. Glucose-sensing mechanisms in eukaryotic cells. *Trends in Biochemical Sciences* **26**: 310-317.

Rolland F, Baena-Gonzalez E, Sheen J. 2006. Sugar sensing and signaling in plants: Conserved and novel mechanisms. *Annual Review of Plant Biology* **57**: 675-709.

Russin WA, Evert RF. 1985. Studies on the leaf of *Populus deltoides* (Salicaceae) - Quantitative aspects, and solute concentrations of the sieve-tube members. *American Journal of Botany* **72**: 487-500.

Saftner RA, Wyse RE. 1984. Effect of plant hormones on sucrose uptake by sugar beet root tissue disks. *Plant Physiology* **74**: 951-955.

Sakai H, Aoyama T, Oka A. 2000. Arabidopsis ARR1 and ARR2 response regulators operate as transcriptional activators. *Plant Journal* **24**: 703-711.

Sakr S NM, Bourbouloux A, Riesmeier J, Frommer WB, Sauer N, Delrot S. 1997. Cutting, ageing and expression of plant membrane transporters. *Biochimica and biophysica acta* **1330**: 207-216.

Salmon S, Lemoine R, Jamai A, Bouchepillon S, Fromont JC. 1995. Study of sucrose and mannitol transport in plasma-membrane vesicles from phloem and nonphloem tissues of Celery (*Apium graveolens* L) Petioles. *Planta* **197**: 76-83.

Sando T, Takeno S, Watanabe N, Okumoto H, Kuzuyama T, Yamashita A, Hattori M, Ogasawara N, Fukusaki E, Kobayashi A. 2008. Cloning and characterization of the 2-C-Methyl-D-erythritol 4-Phosphate (MEP) pathway genes of a natural rubber producing plant, *Hevea brasiliensis*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **72**: 2903-2917.

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

Sauer N. 2007. Molecular physiology of higher plant sucrose transporters. *FEBS Letters* **581**: 2309-2317.

Sauer N, Tanner W. 1989. The Hexose carrier from *Chlorella* cDNA cloning of a eukaryotic H+-cotransporter. *Febs Letters* **259**: 43-46.

Sauer N, Stadler R. 1993. A sink-specific H+/Monosaccharide cotransporter from *Nicotiana tabacum* - cloning and heterologous expression in bakers yeast. *Plant Journal* **4**: 601-610.

Sauer N, Stolz J. 1994. SUC1 and SUC2: two sucrose transporters from Arabidopsis thaliana; expression and characterization in baker's yeast and identification of the histidine-tagged protein. *Plant Journal* **6**: 67-77.

Sauer N, Caspari T, Klebl F, Tanner W. 1990. Functional expression of the *Chlorella* Hexose Transporter in *Schizosaccharomyces pombe*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**: 7949-7952.

Schneider S, Schneidereit A, Konrad KR, Hajirezaei MR, Gramann M, Hedrich R, Sauer N. 2006. *Arabidopsis* INOSITOL TRANSPORTER4 mediates high-affinity H+ symport of myoinositol across the plasma membrane. *Plant Physiology* **141**: 565-577.

Schneider S, Schneidereit A, Udvardi P, Hammes U, Gramann M, Dietrich P, Sauer N. 2007. *Arabidopsis* INOSITOL TRANSPORTER2 mediates H+ symport of different inositol epimers and derivatives across the plasma membrane. *Plant Physiology* **145**: 1395-1407.

Schneider S, Beyhl D, Hedrich R, Sauer N. 2008. Functional and physiological characterization of *Arabidopsis* INOSITOL TRANSPORTER1, a novel tonoplast-localized transporter for myo-inositol. *Plant Cell* **20**: 1073-1087.

Schneidereit A, Scholz-starke J, M. MB. 2003. Functional characterization and expression analysis of the glucose-specific AtSTP9 monosaccharide transporter in pollen of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **133**: 182-190.

Schneidereit A, Scholz-Starke J, Sauer N, Buttner M. 2005. AtSTP11, a pollen tube-specific monosaccharide transporter in *Arabidopsis*. *Planta* **221**: 48-55.

Schofield RA, Bi YM, Kant S, Rothstein SJ. 2009. Over-expression of *STP13*, a hexose transporter, improves plant growth and nitrogen use in Arabidopsis thaliana seedlings. *Plant Cell and Environment* **32**: 271-285.

Scholz-Starke J, Büttner M, Sauer N. 2003. *AtSTP6*, a new pollen-specific H+-monosaccharide symporter from *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **131**: 70-77.

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

Schulze W, Reinders A, Ward J, Lalonde S, Frommer W. 2003. Interactions between co-expressed *Arabidopsis* sucrose transporters in the split-ubiquitin system. *BMC Biochemistry* **4**: 3.

Seetang-Nun Y, Sharkey TD, Suvachittanont W. 2008. Molecular cloning and characterization of two cDNAs encoding 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase from Hevea brasiliensis. *Journal of Plant Physiology* **165**: 991-1002.

Sérier JB. 1993. *L'Histoire du caoutchouc*. Paris.

Serres E, Lacrotte R, Prévôt JC, Clément A, Commère J, Jacob JL. 1994. Metabolic aspects of latex regeneration in situ for three hevea clones. *Rubber India* **7**: 79-84.

Shakya R, Sturm A. 1998. Characterization of source- and sink-specific sucrose/H+ symporters from carrot. *Plant Physiology* **118**: 1473-1480.

Sheldrake AR. 1978. Effects of osmotic stress on polar auxin transport in Avena mesocotyl sections. *Planta* **145**: 113-117.

Shen, B., Jensen, R.G. and Bohnert, H.J. 1997b Mannitol protects against oxidation by hydroxyl radicals. *Plant Physiology* **115**: 527-532.

Shiratake K, Kanayama Y, Yamaki S. 1997. Characterization of hexose transporter for facilitated diffusion of the tonoplast vesicles from pear fruit. *Plant and Cell Physiology* **38**: 910-916.

Silpi U, Chantuma P, Kasemsap P, Thaler P, Thanisawanyangkura S, Lacointe A, Ameglio T, Gohet E. 2006. Sucrose and metabolism distribution patterns in the latices of three *Hevea brasiliensis* clones: effects of tapping and stimulation on the tree trunk. *Journal of Rubber Research* **9**: 115-131.

Silpi U, Lacointe A, Kasempsap P, Thanysawanyangkura S, Chantuma P, Gohet E, Musigamart N, Clement A, Ameglio T, Thaler P. 2007. Carbohydrate reserves as a competing sink: evidence from tapping rubber trees. *Tree Physiology* **27**: 881-889.

Sipat AB. 1982. Hydroxymethyl glutaryl coenzyme A reductase (NADPH) in the latex of *Hevea brasiliensis*. *Phytochemistry* **21**: 851-853.

Sivitz AB, Reinders AM, Johnson E, Krentz AD, Grof CP, Perroux J, Ward JM. 2007. *Arabidopsis* sucrose transporter AtSUC9: high-affinity transport activity, intragenic control of expression, and early flowering mutant phenotype. *Plant Physiology* **143**: 188-198.

Southorn WA, Edwin EE. 1968. Latex flow studies. II. Influence of lutoids on the stability and flow of *Hevea* latex. *Journal of Rubber Research* **20**: 187-200.

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

Southorn WA, Yip E. 1968. Latex flow studies. III. Electrostatic considerations in the colloidal stability of fresh *Hevea* latex. *Journal of Rubber Research* **20**: 201-215.

Spollen, W.G., Tao, W., Valliyodan, B., Chen, K., Hejlek, L.G., et al. 2008 Spatial distribution of transcript changes in the maize primary root elongation zone at low water potential. *Bmc Plant Biology* 8.

Stadler R, Wolf K, Hilgarth C, Tanner W, Sauer N. 1995. Subcellular localization of the inducible *Chlorella* Hup1 monosaccharide-H+ symporter and cloning of a co-induced galactose-H+ symporter. *Plant Physiology* **107**: 33-41.

Stadler R, Truernit E, Gahrtz M, Sauer N. 1999. The AtSUC1 sucrose carrier may represent the osmotic driving force for anther dehiscence and pollen tube growth in *Arabidopsis*. *Plant Journal* **19**: 269-278.

Stadler R, Buttner M, Ache P, Hedrich R, Ivashikina N, Melzer M, Shearson SM, Smith SM, Sauer N. 2003. Diurnal and light-regulated expression of AtSTP1 in guard cells of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **133**: 528-537.

Stoop JMH, Williamson JD, Pharr DM. 1996. Mannitol metabolism in plants: A method for coping with stress. *Trends in Plant Science* **1**: 139-144.

Stougaard J, Jorgensen JE, Christensen T, Kuhle A, Marcker KA. 1990. Interdependence and nodule specificity of *cis*-acting regulatory elements in the soybean leghaemoglobin-Lbc3 and N23 gene promoters. *Molecular & General Genetics* **220**: 353-360.

Subronto. 1978. Correlation studies of latex flow characters and latex minerals content. In *International Rubber Research Development Board*. Kuala Lumpur, Malaysia.

Tarczynski MC, Jensen RG, Bohnert HJ. 1992. Expression of a bacterial Mtld gene in transgenic tobacco leads to production and accumulation of mannitol. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**: 2600-2604.

Terzaghi WB, Cashmore AR. 1995. Light regulated transcription. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **46**: 445-474.

Thomas JC, Sepahi M, Arendall B, Bohnert HJ. 1995. Enhancement of seed-germination in high salinity by engineering mannitol expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell and Environment* **18**: 801-806.

Tjasadihardja, A., Kardjono, W. 1974 Clonal response to stimulation. *Menara Perkebunan* **42**: 227–236

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

Ton J, Jakab G, Toquin V, Flors V, Iavicoli A, Maeder MN, Metraux JP, Mauch-Mani B. 2005. Dissecting the beta-aminobutyric acid-induced priming phenomenon in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **17**: 987-999.

Trüernit E, Sauer N. 1995. The promoter of the *Arabidopsis thaliana* Suc2 sucrose-H+ symporter gene directs expression of beta-glucuronidase to the phloem - Evidence for phloem loading and unloading by Suc2. *Planta* **196**: 564-570.

Trüernit E, Schmid J, Epple P, Illig J, Sauer N. 1996. The sink-specific and stress-regulated *Arabidopsis* STP4 gene: Enhanced expression of a gene encoding a monosaccharide transporter by wounding, elicitors, and pathogen challenge. *Plant Cell* **8**: 2169-2182.

Trüernit E, Stadler R, Baier K, Sauer N. 1999. A male gametophyte-specific monosaccharide transporter in *Arabidopsis*. *Plant Journal* **17**: 191-201.

Tungngoen, K., Kongsawadworakul, P., Viboonjun, U., Katsuhara, M., Brunel, N., Sakr, S., Narangajavana, J. and Chrestin, H. 2009 Involvement of HbPIP2;1 and HbTIP1;1 Aquaporins in Ethylene Stimulation of Latex Yield through Regulation of Water Exchanges between Inner Liber and Latex Cells in Hevea brasiliensis. *Plant Physiology* **151**: 843-856.

Tupy J. 1969b. Stimulatory effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and of 1-naphthylacetic acid on sucrose level, invertase activity and sucrose utilization in the latex of *Hevea brasiliensis*. *Planta* **88**: 144-153.

Tupy J. 1973a. The regulation of invertase activity in the latex of *Hevea brasiliensis*. The effects of growth regulators : bark wounding and latex tapping. *Journal of Experimental Botany* **24**: 516-521.

Tupy J. 1973b. The level and distribution pattern of latex sucrose along the trunk of *Hevea brasiliensis* Müll.Arg. as affected by the sink region induced by latex tapping. *Physiologie Végétale* **11**: 1-11.

Tupy J. 1973c. Influence of yield stimulation on the sucrose content of *Hevea brasiliensis* latex. *Revue Générale des Caoutchoucs et Plastiques* **50**: 311-314.

Tupy J. 1973d. The activity of latex invertase and latex production in *Hevea brasiliensis* Müll. Arg. *Physiologie Végétale* **11**: 633-641.

Tupy J. 1973e. Influence de la stimulation hormonale de la production sur la teneur en saccharose du latex d'*Hevea brasiliensis*. *Revue Générale du Caoutchouc et du Plastique* **50**: 311-314.

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

Tupy J. 1984. Translocation, utilization and availability of sucrose for latex production in *Hevea*. In. *Proceedings of the symposium "Exploitation, physiology and improvement of Hevea"*. Paris France: Irca-Gerdat.

Tupy J. 1985. Some aspects of sucrose transport and utilization in latex producing bark of *Hevea brasiliensis* Müll. Arg. *Biologia Plantarum* **27**: 51-64.

Tupy J. 1989. Sucrose supply and utilization for latex production. In: d'Auzac J, Jacob J, Chrestin H eds. *Physiology of rubber tree latex* Boca Raton, Floride, USA: CRC Press.

Tupy J, Primot L. 1976. Control of carbohydrate metabolism by ethylene in latex vessels of *Hevea brasiliensis* Müll. Arg. in relation to rubber production. *Biologia Plantarum* **18**: 373-383.

Tupy J, Primot L. 1982. Sucrose synthetase in the latex of *Hevea brasiliensis* Müll. Arg. *Journal of Experimental Botany* **33**: 988-995.

Tupy J, Resing WL. 1969. Substrate and metabolism of carbon dioxide formation in *Hevea* latex *in vitro*. *Journal of rubber research of institute of Malaysia* **21**: 456-467.

Van Bel AJE, Hess PH. 2008. Hexoses as phloem transport sugars: the end of a dogma? *Journal of Experimental Botany* **59**: 261-272.

Vaughn MW, Harrington GN, Bush DR. 2002. Sucrose-mediated transcriptional regulation of sucrose symporter activity in the phloem. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**: 10876-10880.

Wang YQ, Xiao YG, Zhang Y, Chai CL, Wei G, Wei XL, Xu HL, Wang M, Ouwerkerk PBF, Zhu Z. 2008. Molecular cloning, functional characterization and expression analysis of a novel monosaccharide transporter gene *OsMST6* from rice (Oryza sativa L.). *Planta* **228**: 525-535.

Ward JM, Kühn C, Tegeder M, Frommer WB. 1998. Sucrose transport in higher plants. *International Review of Cytology- A Survey of Cell Biology* **178**.

Wardlaw IF, Willenbrink J. 1994. Carbohydrate storage and mobilisation by the culm of wheat between heading and grain maturity: the relation to sucrose synthase and sucrose-phosphate synthase. *Functional Plant Biology* **21**: 255-271.

Watari J, Kobae Y, Yamaki S, Yamada K, Toyofuku K, Tabuchi T, Shiratake K. 2004. Identification of sorbitol transporters expressed in the phloem of apple source leaves. *Plant and Cell Physiology* **45**: 1032-1041.

Wayne HL. 1987. Physiology and metabolism of sugar alcohols in higher plants. *Physiologia Plantarum* **70**: 553-557.

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

Weber H, Borisjuk L, Sauer N, Wobus U. 1997. A Role for sugar transporters during seed development: molecular characterization of a Hexose and a Sucrose carrier in fava bean seeds. *Plant Cell* **9**: 895-908.

Weber A, Servaites JC, Geiger DR, Kofler H, Hille D, Groner F, Hebbeker U, Flugge UI. 2000. Identification, purification, and molecular cloning of a putative plastidic glucose translocator. *Plant Cell* **12**: 787-801.

Weig A, Franz J, Sauer N, Komor E. 1994. Isolation of a family of cDNA clones from *Ricinus communis L* with close homology to the hexose carriers *Journal of Plant Physiology* **143**: 178-183.

Weise A, Barker L, Kuhn C, Lalonde S, Buschmann H, Frommer WB, Ward JM. 2000. A new subfamily of sucrose transporters, SUT4, with low affinity/high capacity localized in enucleate sieve elements of plants. *Plant Cell* **12**: 1345-1355.

Weise A, Lalonde S, Kuhn C, Frommer WB, Ward JM. 2008. Introns control expression of sucrose transporter *LeSUT1* in trichomes, companion cells and in guard cells. *Plant Molecular Biology* **68**: 251-262.

Weschke W, Panitz R, Sauer N, Wang Q, Neubohn B, Weber H, Wobus U. 2000. Sucrose transport into barley seeds: molecular characterization of two transporters and implications for seed development and starch accumulation. *Plant Journal* **21**: 455-467.

Williams LE, Lemoine R, Sauer N. 2000. Sugar transporters in higher plants - A diversity of roles and complex regulation. *Trends in Plant Science* **5**: 283-290.

Williamson IP, Kekwick RGO. 1965. The formation of 5-phosphomevaloniate by mevalonate kinase in *Hevea brasiliensis* latex. *Biochem. J.* **96**: 862-871.

Wititsuwannakul R, Wititsuwannakul D, Suwanmanee P. 1990. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase from the latex of *Hevea brasiliensis*. *Phytochemistry* **29**: 1401-1403.

Yanagisawa S. 2000. Dof1 and Dof2 transcription factors are associated with expression of multiple genes involved in carbon metabolism in maize. *Plant Journal* **21**: 281-288.

Yanagisawa S, Schmidt RJ. 1999. Diversity and similarity among recognition sequences of Dof transcription factors. *Plant Journal* **17**: 209-214.

Yang ZP, Zhang L, Diao FQ, Huang MJ, Wu NH. 2004. Sucrose regulates elongation of carrot somatic embryo radicles as a signal molecule. *Plant Molecular Biology* **54**: 441-459.

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

Yeang J, Low F, Gomez J, Paranjothy K, Sivakumaran S. 1984. A preliminary investigation into the relationship between latex invertase and latex vessel plugging in *Hevea brasiliensis*. *Journal of Rubber Research Institute of Malaysia* **32**: 50-62.

Yip E, Gomez JB. 1984. Characterization of cell sap of *Hevea* and its influence on cessation of latex flow. *Journal of Rubber Research* **32**: 1-19.

Yip E, Southorn W. 1968. Latex flow studies, VI. Effects of high pressure gradient on flow of fresh *Hevea* latex in narrow bore capillaries. *Journal of Rubber Research* **20**: 248-256.

Yu DQ, Chen CH, Chen ZX. 2001. Evidence for an important role of WRKY DNA binding proteins in the regulation of NPR1 gene express ion. *Plant Cell* **13**: 1527-1539.

Zarka DG, Vogel JT, Cook D, Thomashow MF. 2003. Cold induction of Arabidopsis CBF genes involves multiple ICE (Inducer of CBF expression) promoter elements and a cold-regulatory circuit that is desensitized by low temperature. *Plant Physiology* **133**(2): 910-918.

Zhang ZL, Xie Z, Zou XL, Casaretto J, Ho THD, Shen QXJ. 2004. A rice WRKY gene encodes a transcriptional repressor of the gibberellin signaling pathway in aleurone cells. *Plant Physiology* **134**: 1500-1513.

Zhou DX. 1999. Regulatory mechanism of plant gene transcription by GT-elements and GT-factors. *Trends in Plant Science* **4**: 210-214.

Zimmerman MH, Ziegler H. 1978. List of sugars and sugar alcohols in sieve-tubes exudates. In: Zimmerman M.H MJA ed. *Encyclopedia of plant physiology* New-york: Springer Verlag.

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

Annexes

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

Annexe 1

Récapitulatif des gènes clonés

Nom	Numéro d'accession	Taille (pb)	Homologie	Taille prot. déduite (aa)
HbSUT1A	DQ985466.1	1596	82% *MeSUT1*	531
HbSUT1B	AM492537.1	1608	79% *MeSUT1*	535
HbSUT2A	DQ985467.1	1833	99% *MeSUT2*	611
HbSUT2B	DQ985465.1	1833	85% *CsSUT2*	611
HbSUT2C	AM491808.1	1920	95% *MeSUT2*	639
HbSUT4	EF067335.1	1494	96% *MeSUT4.1*	498
HbSUT5	EF067333.1	1497	91% *MeSUT4.1*	498
HbHXT1	AM745116	1586	85% *RcSTC*	499
HbPLT1	AM924132.1	1581	74% *MdSOT3*	525
HbPLT2	AM924133.1	1644	76% *PcSorT2*	547

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

Annexe 2

1. Tableau des amorces dégénérées utilisées pour obtenir les sondes

Nom	Séquence (5'-3')	Taille (bases)	Tm (°C)
SUT1_F	T**MY**RR**Y**AC**H**GA**Y**TGG**W**T**K**GG	20	50
SUT1_R	T**WYY**AC**H**GA**Y**TGG**W**T**K**GG	18	50
SUT2_F	CATTT**R**CC**H**CC**B**GC**W**ATGCA	20	48
SUT2_R	ACTCC**K**AT**H**GCCAA**D**CCTTG**Y**CC	23	48
SUT4_F	A**R**AT**Y**TATGGCGGTGAACC	19	49
SUT4_R	AC**R**CCCA**WW**GA**Y**AAGCCTTG**W**CC	23	49
HXT1_F	TT**B**CA**R**CA**NB**T**N**AC**N**GG**N**AT**N**AA	23	46
HXT1_R	GG**N**CCCCA**N**GACCA**N**GCAAA	20	46
PLT_F1	ATGCC**N**GA**R**TC**N**CC**H**CG**B**TGGCT	23	48
PLT_F2	T**B**A**YR**AT**H**GC**N**CC**N**GT**B**TA	19	48
PLT1_R1	A**Y**CTC**N**GA**R**CT**R**TA**NM**CCCA	20	48

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

2. Tableau des amorces utilisées pour la PCR quantitative

Nom	Séquence (5'-3')	Taille (bases)	Tm (°C)
SUT1AF	CAGCTTTTGTGGTGGGGGCGA	21	58
SUT1AR	TGCACATCTATATGATCACATCCA	24	58
SUT1BF	CAGCTTTTGTGGTGGGAGGGG	21	58
SUT1BR	CCAATTTTTGGCCATTGATGCCC	23	58
SUT2AF	GGTTTTCATTTTGGCTAACGACTG	24	58
SUT2AR	TGATAAAGCACTCATCTTTTTACA	24	58
SUT2BF	GGCTTTCCTCTTGCTATTACG	21	58
SUT2BR	GTAAACTCAATTGAAGTGTTTCAGTC	26	58
SUT2CF	TCCTTTGAAAGCATGCGCTAAT	22	58
SUT2CR	GTAAACTCAATTGAAGTGTTTCAGTC	26	58
SUT4F	GCAGTTCTTGGTGTTCCGT	19	58
SUT4R	TCAATGGACTGTTATCTGCAAA	22	58
SUT5F	GCAGTTCTTGGTGTTCCAC	19	58
SUT5R	ATGCTGGCATCCAATCGGATG	21	58
HXT1F	GGGCTTTTCCTCTTCTTTGC	20	58
HXT1R	ACACAGTCTTGGGACCTTGG	20	58
PLTF	TGGGCTATTGCACTGTGCAT	20	58
PLT1R	CCCAACTACAACCTTCAAAGGG	22	58
PLT2R	GTTCTAAGCACCACACGTTACA	22	58

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

Annexe 3

Alignements des séquences de promoteurs clonés

1. PHbSUT1B chez PB217 et PB260

```
HbSUT1B_PB217 AAATTTATAATAAATTAATTTTAAGCGGAAATTTTCGTGATGAGGTTATAAAAGAAAGGG
HbSUT1B_PB260 AAATTTATAATAAATTAATTTTAAGCGGAAATTTTCGTGATGAGGTTATAAAAGAAAGGG
              ************************************************************

HbSUT1B_PB217 AAGTAAGAAAAGAAGAAGAAGAGAAGATGAGAAGAAAAGTCAAATTTTTGCATATCAAGT
HbSUT1B_PB260 AAGTAAGAAAAGAAGAAGAAGAGAAGATGAGAAGAAAAGTCAAATTTTTGCATATCAAGT
              ************************************************************

HbSUT1B_PB217 GGGGAGAATGAAATAGAGAGAAAAACATTTATTAAGCAAGGAATTATTAATGAGAAAAAA
HbSUT1B_PB260 GGGGAGAATGAAATGGAGAGAAAAACATTTATTAAGCAAGGAATTATTAATGAGAAAAAA
              ************************************************************

HbSUT1B_PB217 AATTAATAAATCATTAACAAAGCTTAATTAGTAAATGAAATACAGTAGAATGCAATGACT
HbSUT1B_PB260 AATTAATAAATCATTAACAAAGCTTAATTAGTAAATGAAATACAGTAGAATGCAATGACT
              ************************************************************

HbSUT1B_PB217 AGCCAAATCTGGAAAAGAGAATTAAATATCAGATGCACACGTGGAAAGAAGGAATCTGCA
HbSUT1B_PB260 AGCCAAATCTGGAAAAGAGAATTAAATATCAGATGCACACGTGGAAAGAAGGAATCTGCA
              ************************************************************

HbSUT1B_PB217 CCGTACACTATTTTGCAACTGAAGACGTAGACCATTTTGGATAAGGCCATACCCACTCTT
HbSUT1B_PB260 CCGTACACTATTTTGCAACTGAAGACGTAGACCATTTTGGATAAGGCCATACCCACTCTT
              ************************************************************

HbSUT1B_PB217 TGCCAGTTGCCACTCTATTATAAATTCCCATGCAAATCCGACCCAACTATGTACAAAACC
HbSUT1B_PB260 TGCCAGTTGCCACTCTATTATAAATTCCCATGCAAATCCGACCCAACTATGTACAAAACC
              ************************************************************

HbSUT1B_PB217 ACCTCTCTACTTCTACCACCACCACAACCACCATCACCGCCGCCACACTCTTCTCACCAC
HbSUT1B_PB260 ACCTCTCTACTTCTACCACCACCACAACCACCATCACCGCCGCCACACTCTTCTCACCAC
              ************************************************************

HbSUT1B_PB217       CAACTCCCATG 491
HbSUT1B_PB260       CAACTCCCATG 491
                    ***********
```

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

2. PHbPLT1 chez PB217 et PB260

```
HbPLT1_PB217 CCTATCACTGTAATCTAATTTCAAGAAAATAAATGGACAGAGTCTGGCCACAAATTGGAC
HbPLT1_PB260 CCTATCACTGTAATCTAATTTCAAGAAAATAAATGGACAGAGTCTGGCCACAAATTGGAC
             ************************************************************

HbPLT1_PB217 TATCCAACGGGGAGTTTTTAACTCACGTGACCTATAATCACAATATATCAATATCTTGGG
HbPLT1_PB260 TATCCAACGGGGAGTTTTTAACTCACGTGACCTATAATCACAATATATCAATATCTTGGG
             ************************************************************

HbPLT1_PB217 AAGGAGCTCAGTACACTCTCACAATTCTCAAACAGACATATATAATCCAATTGGAGCTCA
HbPLT1_PB260 AAGGAGCTCAGTTCACTCTCACAATTCTCAAACAGACATATATAATCCAATTGGAGCTCA
             ************ ************************************************

HbPLT1_PB217 GCTCCCTAATCCAAGTAAATACCCATTCCATAATACCAACATAACCATATAATATCTGTA
HbPLT1_PB260 GCTCCCTAATCCAAGTAAATACCCATTCCATAATACCAACATAACCATATAATATCTGTA
             ************************************************************

HbPLT1_PB217 CAACTTCAAAAAAATAAATTGTTACAGTCCCAAATCAAAATTTGAACACTACTAGCACGT
HbPLT1_PB260 CAACTTCAAAAAAATAAATTGTTACAGTCCCAAATCAAAATTTGAACACTACTAGCACGT
             ************************************************************

HbPLT1_PB217 GCGAAGTTCTAGATTAGAAAGTAAGGAAATAAAATCATAATAAAACTTTTACAGGTAAAT
HbPLT1_PB260 GCGAAGTTCTAGATTAGAAAGTAAGGAAATAAAATCATAATAAAACTTTTACAGGTAAAT
             ************************************************************

HbPLT1_PB217 CTATGAGAAAGAAAGCAAGTTAATCTCAAAAAATCCTCCTGTCATCTGGGAAAAATAGTT
HbPLT1_PB260 CTATGAGAAAGAAAGCAAGTTAATCTCAAAAAATCCTCCTGTCATCTGGGAAAAATAGTT
             ************************************************************

HbPLT1_PB217 GAATAAGAGTGAGCGTTCGACTCATAGAGTAAGATATTGATTTTAAATACAATTTCTATA
HbPLT1_PB260 GAATAAGAGTGAGCGTTCGACTCATAGAGTAAGATATTGATTTTAAATACAATTTCTATA
             ************************************************************

HbPLT1_PB217 ACTAAGGCTAATGCATCCCTAAGTATGAAATGCAATATATACAAACATATTCAAATAATA
HbPLT1_PB260 ACTAAGGCTAATGCATCCCTAAGTATGAAATGCAATATATACAAACATATTCAAATAATA
             ************************************************************

HbPLT1_PB217 ATCGCACAAAAGATAATTTAGAGCACTCATATACCCGTGTGTCACATCACCGTATGTAAA
HbPLT1_PB260 ATCGCACAAAAGATAATTTAGAGCACTCATATACCCGTGTGTCACATCACCGTATGTAAA
             ************************************************************

HbPLT1_PB217 TATGGGAGCTAATTCCCTATGCAGTTCTCTTAATCCAATGCTTGTCAATGAGATTAAATT
HbPLT1_PB260 TATGGGAGCTAATTCCCTATGCAGTTCTCTTAACCCAATGCTTGTCAATGAGATTAAATT
             ********************************** ************************

HbPLT1_PB217 GAGCTAGACTTTCTCTTATTAATCCAAATGCGAGAGTCAGCGAGATCAACTCAAAGCCAG
HbPLT1_PB260 GAGCTAGACTTTCTCTTATTAATCCAAATGCGAGAGTCAGCGAGATCAACTCAAAGCCAG
             ************************************************************

HbPLT1_PB217 ACTCACCCCGACTTATCTATATATAAGGATCGAGTTTCAGCGAGTCAAGCTCTAGCTACG
HbPLT1_PB260 ACTCACCCCGACTTATCTATATATAAGGATCGAGTTTCAGCGAGTCAAGCTCTAGCTACG
             ************************************************************

HbPLT1_PB217 ACTACCCATCCTATCCAAGTCCACATCCATACTATACACACACCAACACACGTACACAGC
HbPLT1_PB260 ACTACCCATCCTATCCAAGTCCACATCCATACTATACACACACCAACACACGTACACAGC
             ************************************************************

HbPLT1_PB217 TCCAAATTACTTTAAGACGACATCCACAAACAAGTTCAACAAAGTATGTAATAAAAGAGT
HbPLT1_PB260 TCCAAATTACTTTAAGACGACATCCACAAACAAGTTCAACAAAGTATGTAATAAAAGAGT
             ************************************************************
```

```
HbPLT1_PB217 GTGCTTAGCGTTTAACTAAATATATACATACATATATGTGAATGCATAAGCATGCCTTAA
HbPLT1_PB260 GTGCTTAGCGTTTAACTAAATATATACATACATATATGTGAATGCATAAGCATGCCTTAA
             ************************************************************

HbPLT1_PB217 ATATAAATTGTTAATATTGAAATTATAAATAAAATCAATATTTACTCATAGATTAATCAA
HbPLT1_PB260 ATATAAATTGTTAATATTGAAATTATAAATAAAATCAATATTTACTCATAGATTAATCAA
             ************************************************************

HbPLT1_PB217 AGTTCATTGAGGCAGCTGGGAGGAGGAGGAGGGTTGACTCGAATCACCTAAACAATTATA
HbPLT1_PB260 AGATCATTGAGGCAGCTGGGAGGAGGAGGAGGGTTGACTCGAATCACCTAAACAATTATA
             ** ***********************************************************

HbPLT1_PB217 TTCATGAATTTATCAATATTAAAATAAAATAAGGACTTAAAGAGTTAAAGACACTCTAAA
HbPLT1_PB260 TTCATGAATTTATCAATATTAAAATAAAATAAGGACTTAAAGAGTTAAAGACACTCTAAA
             ************************************************************

HbPLT1_PB217 TTTATGCCAAAAATCTGATAAAATTTTTCATGCACTTAAGACTTACCAAATTTGCAAAAC
HbPLT1_PB260 TTTATGCCAAAAATCTGATAAAATTTTTCATGCACTTAAGACTTACCAAATTTGCAAAAC
             ************************************************************

HbPLT1_PB217 AGGTTAAATAACACTTCTTAATTCAAAGGCCGTAAACCCACAATACAACAACATCATAAT
HbPLT1_PB260 AGGTTAAATAACACTTCTTAATTCAAAGGCCGTAAACCCACAATACAACAACATCATAAT
             ************************************************************

HbPLT1_PB217 GCCCCTCTTGGGCTTGCCACAACAGTCAAAAATCACGTATTTATATTATTTAGCTTAGTT
HbPLT1_PB260 GCCCCTCTTGGGCTTGCCACAACAGTCAAAAATCACGTATTTATATTATTTAGCTTAGTT
             ************************************************************

HbPLT1_PB217 GTTAAGCTTAAAGCATAAAGTTATAATATATAATATATTAAGTTATATATAATAGAACTT
HbPLT1_PB260 GTTAAGCTTAAAGCATAAAATTATAATATATAATATATTAAGTTATATATAATAGAACTT
             ******************* ****************************************

HbPLT1_PB217 TTTTTTATATGCTTTAGAAAATTATTACCTCTTGCGTGTAATATAATCTTTAATCAATTA
HbPLT1_PB260 TTTTTTATATGCTTTAGAAAATTATTACCTCTTGCGTGTAATATAATCTTTAATCAATTA
             ************************************************************

HbPLT1_PB217 TAAATTTAGAATTTATATTATAGACATTTGAATTTATGTTGATTATAAATATATATTAAT
HbPLT1_PB260 TAAATTTAGAATTTATATTATAGACATTTGAATTTATGTTGATTATAAATATATATTAAT
             ************************************************************

HbPLT1_PB217 TAAAATATAATTTTATTTTTTTAATATTGAAAAATTAATAATTCACACCTCTTTCTCAAA
HbPLT1_PB260 TAAAATATAATTTTATTTTTTTAATATTGAAAAATTAATAATTCACACCTCTTTCTCAAA
             ************************************************************

HbPLT1_PB217 TATCACAGTATAATTTCAAATTTTCAATAAAACAAACTAACATATATGTTACTTTAATAA
HbPLT1_PB260 TATCACAGTATAATTTCAAATTTTCAATAAAACAAACTAACATATATGTTACTTTAATAA
             ************************************************************

HbPLT1_PB217 AATAAATTCAATTTGATAAGATTTAATTTATACAATAATAATTTTTTATTTTAATTTAAT
HbPLT1_PB260 AATAAATTCAATTTGATAAGATTTAATTTATACAATAATAATTTTTTATTTTAATTTAAT
             ************************************************************

HbPLT1_PB217 TCGATATTTTTTTTATTCGGTAAATGTTGTAATTAAAAAAAAACTATCCATTCAAATTAA
HbPLT1_PB260 TCGATATTTTTTTTATTCGGTAAATGTTGTAATTAAAAAAAAACTATCCATTCAAATTAA
             ************************************************************


HbPLT1_PB217 ACAAATGAGCTTTGAGAATGTTGATATTATTATGATTTACTTATTATTTTTTTTAAAGCC
HbPLT1_PB260 ACAAATGAGCTTTGAGAATGTTGATATTATTATGATTTACTTATTATTTTTTT-AAAGCC
             ************************************************** ******
```


tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

```
HbPLT1_PB217 AAATAGTTATTACAAGATGATGGTCCAAGCCGTTTGTCTATATAAGCAAATCCAGTTTCC
HbPLT1_PB260 AAATAGTTATTACAAGATGATGGTCCAAGCCGTTTGTCTATATAAGCAAATCCAGTTTCC
             ************************************************************

HbPLT1_PB217 CATGGAGCTAGCATCCCCAAACTTCTGCTCTTCATGGCTGCTTGAGTTTATCCAAAACAA
HbPLT1_PB260 CATGGAGCTAGTATCCCCAAACTTCTGCTCTTCATGGCTGCTTGAGTTTATCCAAAACAA
             ********** ************************************************

HbPLT1_PB217 CCTTATACAACCCTAAACACCACTTTTAAATCTCTCTCCCTCTCTCTCTCACTTGCTCTC
HbPLT1_PB260 CCTTATACAACCCTAAACACCACTTTTAAATCTCTCTCCCTCTCTCTCTCACTTGCTCTC
             ************************************************************

HbPLT1_PB217 TTGCTGTTGAGGTGCAGAGAGATG 2004
HbPLT1_PB260 TTGCTGTTGAGGTGCAGAGAGATG 2003
             ************************
```

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

3. PHbPLT2 chez PB217 et PB260

```
HbPLT2_PB217 ATCTTTTTTATGGTCCTTTTGATTTTTTTTTT--AATTTTAAATGGGAATGACTTTTATC
HbPLT2_PB260 ATCTTTTTTATGGTCCTTTTGATTTTTTTTTTTTTAATTTTAAATGGGAATGACTTTTATC
             ******************************  *************************

HbPLT2_PB217 ATTTAATTTGACAAGCAATAGAACTTTAATATGGTAACTATTTTATTGATAATTAATTTG
HbPLT2_PB260 ATTTAATTTGACAAGCAATAGGACTTTAATATGGTAACTATTTTATTGATAATTAATTTG
             ******************** ************************************

HbPLT2_PB217 ATATGGCTATTTATATCAGTTCTTTCATTTAATCAAATATCTACATCCAATTTTAACTTC
HbPLT2_PB260 ATATGGTTATTTATATCAGTTCTTTCTTTAAATCAAATATCTACATCCAATTTTAACTTC
             ****** ******************** ** ******************************

HbPLT2_PB217 TAATTACCCAATTATGCCATATTTTTTTATCAATAATAATAATAATAATAATAATAATAA
HbPLT2_PB260 TAATTATCCAATTATGCCATTTTTTTTTATCAATAATAATAATAATAATAATA-------
             ****** ************* ********************************

HbPLT2_PB217 TAATAGTTTATGAATTTCTTGTTAAACTCTTCTTTTGTGAGAGTAATCATTAAGTCCTAA
HbPLT2_PB260 -----GTTTATGAATTTCTTGTTAAACTCTTCTTTTTTGAGAGTAATCATTAAGTCCTAA
                  ****************************** ************************

HbPLT2_PB217 TAACAATAAATCTTAGTTAAGTTCTTTCTTTTGACTAGTCTAACTTAATTAGTTGGACCA
HbPLT2_PB260 TAACAATAAATCTTAGTTAAGTTCTTTCTTTTGACTAGTCTAACTTAATGAGTTGGACCA
             ************************************************ ***********

HbPLT2_PB217 TAATTTGTTTAAGCTTACGTATAGATTATCCATTTGACTCCCTCATTAATTAATAGTAAT
HbPLT2_PB260 TAATTTGTTTAAGCTTACGTATAGATTATCCATTTGACTCCCTCATTAATTAATAGTAAT
             ************************************************************

HbPLT2_PB217 TCACATAGTCATCATCTGCTTTATAAAATTCTTATCTATACCTAATTAATTATAAACTTA
HbPLT2_PB260 TCACATAGTCATCATCTGCTTTATAAAATTCTTATCTATACCTAATTAATTATGAACTTA
             ************************************************** ******

HbPLT2_PB217 ATATATATAATATATATATTTAATAGATATAACCTTATTATATATCTTATATTTTGAATT
HbPLT2_PB260 AAATATATAATATATGTATTTAATAGGTATAACCTTATTATACATCTTATATTTTGAATT
             * ************** ********** *************** *****************

HbPLT2_PB217 AATGATTGATTACTGATATTATAATTAATTTTTTTTTAAATCATTTAAAAAAAGGTGATA
HbPLT2_PB260 AATGATTGATTACTGATATTATAA--------TTTGTAATTTAAAAAAAAAATGGTGATA
             ************************         *** *** * *   ****** *******

HbPLT2_PB217 TATATATATAAAAAACTTATCTATTAATAATTTAAAGTAAAAACATGGATATTCATTGAT
HbPLT2_PB260 TATATAAATA-----CTTATCTATTAATAATTTAAAGTAAAAACATGGATATTCATTGAT
             ****** ***     *******************************************

HbPLT2_PB217 TTGATTTAAAAACATTATATTCTATAATATTTCTTGAGAAAAAAAAAA--GAAATTATTT
HbPLT2_PB260 TTGATTTAAAAACATTATATTCTATAATATTTCTTGAGAAAAAAAAAAAAGAAATTATTT
             ************************************************  **********

HbPLT2_PB217 CCTTAAATTTTAAAAGAAATCAAGAGTAATTGAAAGGATATATAAAAACTGCCCACATCA
HbPLT2_PB260 CCTTAAATTTTAAAAGAAATCAAGAGTAATTGAAAAGATATATAAAAACTGCCCACATCA
             ********************************** ************************

HbPLT2_PB217 TTGATTTCAT--------AAATTAAATTTAAATAAAAATTTTTAAAAATTAAAAAATATA
HbPLT2_PB260 TTGATTTCATTGTCTGATAAATTAAATTTAAATAAAAATTTTTAAAAATTAAAAAATATA
             **********        ******************************************

HbPLT2_PB217 TATCCTAAAAAACTTATTTATATATTTGGTTTATTATGAATATAAATAAATATATATAAA
HbPLT2_PB260 TATCCTAAAAAACTTATTTATATTTTTGGTTTATTATGAATATAAATAAATATATAAAAA
             ********************** ********************************* ***
```


tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

```
HbPLT2_PB217 TTTTAATTATTTTTATATATCGGTCTTATAATAGATGGACGGACTAGCATTTCCCTGCAT
HbPLT2_PB260 TTTTAATTATTTTTATATATCGGTCTTATAACAGATGGACGGACTAGCATTTCCCTGCAT
             ******************************* ***************************

HbPLT2_PB217 ATCCATCCAAAATAAACGAATCCGCGGGTAAAACAGGTCGCTCACATGATTTTATTTATT
HbPLT2_PB260 ATCCATCCAAAATAAACGAATCCGCGGGTAAAACAGGTCGCTCACATGATTTTATTTTTC
             ************************************************************ *

HbPLT2_PB217 TTTTTTCTTTTTAAGCTAATTAATTGTTACAAAATGATGACAACCCAAGCCTTGTTTGTC
HbPLT2_PB260 TTTTTTCTTTTTAAGCTAATTAATTGTTACAAAATGATGACAACCCAAGCCTTGTTTGTC
             ************************************************************

HbPLT2_PB217 TATATAAGCAAATCCAGTTTCCCAAAGAGCTTGCATCCTACTCTTCATGGCTGCTTGAGT
HbPLT2_PB260 TATATAAGCAAATCCAGTTTCCCAAAGAGCTTGCATCCTGCTCTTCATGGCTGCTTGAGT
             ************************************ ********************

HbPLT2_PB217 TTATTCAAAACAACTTTACACAATCCTAAACACCCTTTAGACTTCTATTCCTCTTTCTTT
HbPLT2_PB260 TTATTCAAAACAACTTTACACAATCCTAAACACCCTTTAGACTTCTATTCCTCTTTCTTT
             ************************************************************

HbPLT2_PB217 CTCTCTTGCTCTTGAGGTGAAGAGAGATG 1217
HbPLT2_PB260 CTCTCTTGCTCTTGAGGTGAAGAGAGATG 1204
             ****************************
```

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

tel-00725589, version 1 - 27 Aug 2012

Résumé

L'hévéa est un arbre qui revêt un fort intérêt économique à l'échelle mondiale. Il représente la seule source de caoutchouc naturel commercialement exploitée. La demande grandissante de cette matière première a conduit à l'initiation de nombreuses recherches visant à augmenter la production de latex.

La biosynthèse du caoutchouc à partir du saccharose se déroule dans le cytoplasme (latex) des cellules laticifères. Hétérotrophes et dépourvues de plasmodesme, les cellules laticifères disposeraient d'un équipement membranaire de transporteurs actifs spécifique, afin de répondre à leurs besoins importants en photoassimilats. Toutefois, le rôle de ces transporteurs dans la physiologie des cellules laticifères n'a jamais été élucidé. Ce travail propose la première étude moléculaire des co-transporteurs H+/ sucres solubles et H+/polyol (quebrachitol) au sein des cellules laticifères, en relation avec la production de latex.

Ce travail a permis l'identification des premiers co-transporteurs de saccharose, d'hexoses et de polyols chez l'hévéa. Dix gènes de transporteurs ont été clonés dans les cellules laticifères : 7 transporteurs putatifs de saccharose (*HbSUT1A*, *HbSUT1B*, *HbSUT2A*, *HbSUT2B*, *HbSUT2C*, *HbSUT4*, *HbSUT5*), 1 transporteur putatif d'hexoses (*HbHXT1*) et 2 transporteurs putatifs de polyols (*HbPLT1*, *HbPLT2*). Ensuite, les caractérisations physiologiques et moléculaires fines de ces transporteurs ont permis la mise en évidence du rôle potentiel et complémentaire de *HbSUT1B*, *HbHXT1* et *HbPLT2* dans la production de latex. *HbSUT1B* et *HbHXT1* seraient impliqués dans la régulation de la régénération du latex, alors que *HbPLT2* interviendrait dans le contrôle de l'écoulement. Ces trois gènes sont proposés en tant que marqueurs moléculaires potentiels de production.